

**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

**BULLETIN OF BIOTECHNOLOGY
AND PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY
NAMED AFTER Yu.A. OVCHINNIKOV**

Scientific and practical journal

Founded in 2005

Chief editor

R.G. Vasilov

Editorial board

V.S. Vorobyev, T.N. Gaeva, S.I. Mataev, A.A. Nazarenko

Editorial council

V.G. Debabov (Moscow), V.T. Ivanov (Moscow), M.P. Kirpichnikov (Moscow),
E.I. Kolomiets (Minsk, Republic of Belarus), A.I. Miroshnikov (Moscow),
T.V. Ovchinnikova (Moscow), V.O. Popov (Moscow),
EM. Ramankulov (Astana, Republic of Kazakhstan), A.N. Reshetilov (Pushchino),
E.K. Khusnutdinova (Ufa), N.K. Yankovsky (Moscow)

The journal is registered in Rosokhrankultura
Reg. PI No. FS77-19745 dated April 11, 2005

Head edited by O.V. Colombet

Address: 123060, Moscow, PO Box 3

Tel.: +7 (495) 648-09-13

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

Founder and Publisher:

ANO «Information and Analytical Center
medical and social problems»

Address: 127581 Moscow, Keramicheskyy proezd, 53, box. one

Tel.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Published with the support of the
Russian Biotechnology Society named after Yu.A. Ovchinnikov

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Васильев 5

Оригинальные статьи

Безмембранный биотопливный элемент с анодом с биопленкой почвенных бактерий.

*М.В. Вишневецкая, М.П. Жиянова, Д.А. Харьков, П.М. Готовцев,
Ю.М. Парунова, Р.Г. Васильев* 6

Биотехнологический потенциал дереворазрушающих грибов для получения биотоплива.

*В.В. Володин, Н.Н. Шергина, В.В. Мартынов, С.О. Володина,
А.А. Шубаков, Е.Ю. Кожевникова, Т.И. Ширшова, Р.Г. Васильев* 11

Применение микроводорослей в очистке сточных вод, содержащих отходы целлюлозно-бумажного производства и коммунальные стоки.

*А.В. Гогонин, Т.Н. Щемелинина, И.В. Новаковская, Е.Н. Патова,
Е.М. Анчугова, В.А. Лукьянов, Т.Н. Гаева, В.В. Володин* 24

Оценка результатов испытаний экспериментального фага для диагностики холеры эльтор.

*К.С. Гумаюнова, О.С. Зинина, М.В. Овчинникова, Н.Е. Гаевская,
Ю.В. Синягина, А.К. Никифоров* 34

Структура грамположительных бактерий, изолированных от пациентов с диагнозом внебольничной пневмонии.

*О.Н. Колотова, Л.В. Катаева, И.В. Бакитановская,
Т.Ф. Степанова, К.Б. Степанова* 41

Продуцирование целлюлаз аскомицетным грибом *Trichoderma viride* после длительного хранения в коллекции.

*А.А. Шубаков, С.О. Володина, В.В. Мартынов,
Н.Н. Шергина, В.В. Володин* 48

Обзоры

Твердые формы лекарственных бактериофагов (обзор литературы).

*А.В. Комиссаров, М.В. Овчинникова, Д.Н. Бибииков, Н.В. Синицына,
Е.А. Глазкова, К.С. Гумаюнова, О.С. Зинина, А.К. Никифоров* 55

Современные тенденции в применении нейросетевых алгоритмов в биотехнологии фототрофных микроорганизмов.

П.С. Назин, К.В. Горин, П.М. Готовцев, Р.Г. Васильев 65

Правила для авторов 79

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 5

Original articles

Membraneless biofuel cell with soil bacteria biofilm anode.

*M.V. Vishnevskaya, M.P. Zhiyanova, D.A. Kharkov,
P.M. Gotovtsev, Yu.M. Parunova, R.G. Vasilov* 6

Biotechnological potential of wood-destroying fungi for biofuel production.

*V.V. Volodin, N.N. Shergina, V.V. Martynov, S.O. Volodina, A.A. Shubakov,
E.Yu. Kozhevnikova, T.I. Shirshova, R.G. Vasilov* 11

The application of microalgae in the treatment of effluents containing both pulp-and-paper waste and municipal drainage.

*A.V. Gogonin, T.N. Schemelinina, I.V. Novakovskaya, E.N. Patova,
E.M. Anchugova, V.A. Lukyanov, T.N. Gaeva, V.V. Volodin* 24

Evaluation of the test results of an experimental phage for the diagnosis of *Cholera* El Tor.

*K.S. Gumayunova, O.S. Zinina, M.V. Ovchinnikova, N.E. Gaevskaya,
Yu.V. Sinyagina, A.K. Nikiforov* 34

The structure of gram-positive bacteria isolated from patients with a diagnosis of community-acquired pneumonia.

O.N. Kolotova, L.V. Kataeva, I.V. Bakshtanovskaya, T.F. Stepanova, K.B. Stepanova 41

Comparative study of cellulase activity of two production strains of *Trichoderma viride* after long-term storage in collection.

*A.A. Shubakov, S.O. Volodina, V.V. Martynov,
N.N. Shergina, V.V. Volodin* 48

Reviews

Solid forms of medicinal bacteriophages (review of the literature).

*A.V. Komissarov, M.V. Ovchinnikova, D.N. Bibikov, N.V. Sinitsyna,
E.A. Glazkova, K.S. Gumayunova, O.S. Zinina, A.K. Nikiforov* 55

Modern trends in the use of neural network algorithms in biotechnology of phototrophic microorganisms.

P.S. Nazin, K.V. Gorin, P.M. Gotovtsev, R.G. Vasilov 65

Rules for authors 79

К читателям

В четвертом номере 2021 года подобраны работы, среди которых видное место занимают исследования, выполненные с участием сотрудников НИЦ «Курчатовский институт». В статье Гогонина А.В. с соавторами была проведена оценка влияния микроводорослей на процессы очистки сточных вод лесопромышленного комплекса, смешанных с городскими канализационными стоками.

В работе М.В. Вишневецкой и др. изучались микробные топливные элементы с биоанодом в виде графитированной ткани с наращённым на нее слоем почвенных бактерий за счет вымачивания анода в богатой питательной среде и помещения его в почву на сутки. Полученная максимальная выходная мощность равна 101,4 мВт/м², а максимальная электроемкость — 65,6 мФ/м².

В исследовании Володина В.В. и др. из Сыктывкара и Москвы «Биотехнологический потенциал дереворазрушающих грибов для получения биотоплива» дана биотехнологическая оценка применения указанных грибов в качестве биологических агентов в процессах предварительной делигнификации древесного сырья и осахаривания целлюлозы на ключевой стадии ферментативного гидролиза при получении биоэтанола.

Шубаков А.А. и др. (Сыктывкар) провели сравнительное изучение целлюлазной активности двух производственных штаммов *Trichoderma viride* после длительного хранения в коллекции.

Колотова О.Н. с другими сотрудниками Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора проанализировали видовой состав грамположительных бактерий, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей от пациентов с диагнозом «Внебольничная пневмония».

Группа исследователей (Гумаюнова К.С. и др.) из РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов) подвела итоги результатов испытаний экспериментального фага для диагностики холеры эльтор.

Другой коллектив саратовских ученых (Комиссаров А.В. и др.) подготовил обзор литературы о твердых формах лекарственных бактериофагов.

В обзоре Назина П.С. с коллегами (НИЦ «Курчатовский институт») представлен обзор данных об искусственных нейронных сетях (ИНС), включая многослойные перцептронные ИНС с обратным распространением ошибки, ИНС с глубоким обучением и сверточные ИНС.

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

БЕЗМЕМБРАННЫЙ БИОТОПЛИВНЫЙ ЭЛЕМЕНТ С АНОДОМ С БИОПЛЕНКОЙ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ

М.В. ВИШНЕВСКАЯ^{1*}, М.П. ЖИЯНОВА², Д.А. ХАРЬКОВ³, П.М. ГОТОВЦЕВ¹,
Ю.М. ПАРУНОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ¹

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,*

² *ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,*

³ *ФГАОУ ВО «Московский политехнический университет», Москва*

Одним из важнейших вопросов современной науки является развитие альтернативных источников энергии. Биотопливные элементы служат неотъемлемой частью развития индустрии в данной области. Особый интерес на сегодняшний день вызывают почвенные микробные топливные элементы (МТЭ). Почва богата различными микроорганизмами, которые способны объединяться в биопленки. Они, в свою очередь, могут генерировать высокую электроэнергию. Почвенные МТЭ находят применение для биоремедиации почвы от органических загрязнителей, а также для очистки воды. В данной статье исследовался МТЭ с биоанодом в виде графитированной ткани с наращённым на нее слоем почвенных бактерий за счет вымачивания анода в богатой питательной среде и помещения его в почву на сутки. Полученная максимальная выходная мощность равна 101,4 мВт/м², а максимальная электроемкость — 65,6 мФ/м². Ячейка топливного элемента являлась безмембранной и безмедиаторной, что делает ее экономически выгодной. Таким образом, почвенные МТЭ представляют собой перспективное направление в проблеме изучения альтернативной биоэнергетики.

Ключевые слова: микробный топливный элемент, биопленка почвенных бактерий, графитированная ткань.

Введение

На сегодняшний день в мире активно занимаются поиском альтернативных источников энергии. Биотопливные элементы как раз являются инструментом решения данной проблемы. Микробные топливные элементы (МТЭ) — это устройства, генерирующие электрический ток за счет протекающих в микроорганизмах окислительно-восстановительных реакций. Настоящая работа направлена на изучение потенциала электрогенерирующих почвенных микроорганизмов в качестве основы для создания МТЭ.

В последнее время увеличивается интерес к МТЭ, работающим в почвах [5, 11]. Они интересны не только как инструмент альтернативной энергетики, но и применимы для биоремедиации почв, очистки их от углеродных (таких как нефть), органических загрязнителей [4], а также способны очищать воду в почве [6]. Большим преимуществом почвенных МТЭ является то, что в них нет необходимости

вносить регулярную подпитку, так как почва обладает и большим количеством микроорганизмов для работы и органикой для поддержания их жизнедеятельности [7].

Преимущественной формой организации микроорганизмов являются биопленки. Процесс формирования биопленки состоит из нескольких этапов. На первом этапе микроорганизмы сорбируются на поверхности субстрата. Этот процесс может быть обратимым. Далее они окончательно фиксируются, выделяя внеклеточные полимеры. Далее адгезированные клетки скапливаются, образуя микроколонию. На завершающем этапе микроколонии сливаются, образуя зрелую биопленку, обладающую трехмерной структурой [2]. Способность образовывать биопленки обеспечивает МТЭ на их основе физиологическую и функциональную стабильность. Именно такая организация позволяет генерировать высокую удельную мощность, приближенную к теоретическим пределам [9].

Для максимизации электрической мощности и ее стабильной генерации важен выбор материала электрода. Он должен обеспечивать хорошую проводимость, биосовместимость, химическую стабильность, обладать высокой удельной поверхностью [3]. Достаточно распространенными и подходящими являются углеродные материалы (графит, графитированные волокна и ткани, углеродные войлоки и пены, углеродные нанотрубки и

© 2021 г. Вишневская М.В., Жиянова М.П., Харьков Д.А., Готовцев П.М., Парунова Ю.М., Васильев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Вишневская Мария Владиславовна
младший научный сотрудник, отдел биотехнологии и биоэнергетики,
НИЦ «Курчатовский институт»

E-mail: Vishnevskaya_MV@nrcki.ru

графен). В данной работе была выбрана графитированная ткань, которая является недорогим материалом и обладает всеми свойствами, необходимыми для работы с микроорганизмами, в том числе нетоксичность, устойчивость к коррозии и пористость [10], что делает ее оптимальной для использования в почвенном МТЭ.

Таким образом, цель работы заключалась в исследовании работы МТЭ с биопленкой почвенных бактерий в качестве биокатализатора на аноде из графитированной ткани.

Материалы и методы

Материалы и реагенты. Для данной работы был использован верхний органоминеральный горизонт почвы. В качестве электродов использовалась графитированная ткань ТГН-2МК, предоставленная АО «НИИГрафит», толщиной около 0,5 мм. Электролитом выступала среда, имитирующая сточные воды (X1), состава (мг/л): 1000 – глюкозы, 95,5 – NH_4Cl , 56,3 – мочевины, 22,6 – KH_2PO_4 , 12,6 – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 309 – NaHCO_3 , 35 – дрожжевого экстракта [12].

Испытательный стенд. В качестве безмембранной ячейки МТЭ для экспериментов использовали химический стакан (объем 100 мл) с электродами, опущенными в него и закрепленными на штативе с помощью стандартных электротехнических зажимов за стенки ячейки.

Подготовка электродов. В качестве катода был использован прямоугольный отрезок графитированной ткани размером 75×25 мм. Для анода использовалась та же ткань размера 70×25 мм. До начала экспериментов анод замачивался в среде X1 на 1 час, а затем помещался в

почву на глубину 10–15 см. Время нахождения электрода в почве составляло 5 суток. Между повторностями измерений электроды хранились в герметично закрытых чашках Петри.

Электрохимические измерения. Измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) проводились на потенциостате-гальваностате Autolab PGSTAT204 (Mertohm) (ПО NOVA 2.0). Для анализа работы почвенного МТЭ использовались методы хронопотенциометрии, хроноамперометрии, линейной и циклической потенциостатической вольтамперометрии. Измерения вольтамперометрии проводились в диапазоне задаваемой разности потенциалов от -0,3 до +0,3 В, чтобы охватить ожидаемые окислительно-восстановительные процессы системы [1], со скоростью развертки потенциала 5 мВ/с. Все измерения проводились при комнатной температуре (23 ± 1 °С).

Результаты и обсуждение

По проведенным экспериментам для анализа работы ячейки МТЭ с биопленками почвенных бактерий на аноде были построены диаграммы сравнения и рассчитаны ВАХ.

Сравнительные циклические диаграммы зависимости силы тока от разности потенциалов для исследуемого почвенного МТЭ по форме соотносятся со статьями в других исследованиях работы биотопливных элементов [8] (рис. 1). Максимальная удельная мощность ячейки почвенного МТЭ на первый день эксперимента составляла 62,8 мВт/м². Максимальная удельная мощность за все дни проведения экспериментов была достигнута на 10-й день и равнялась 101,4 мВт/м² (рис. 2).

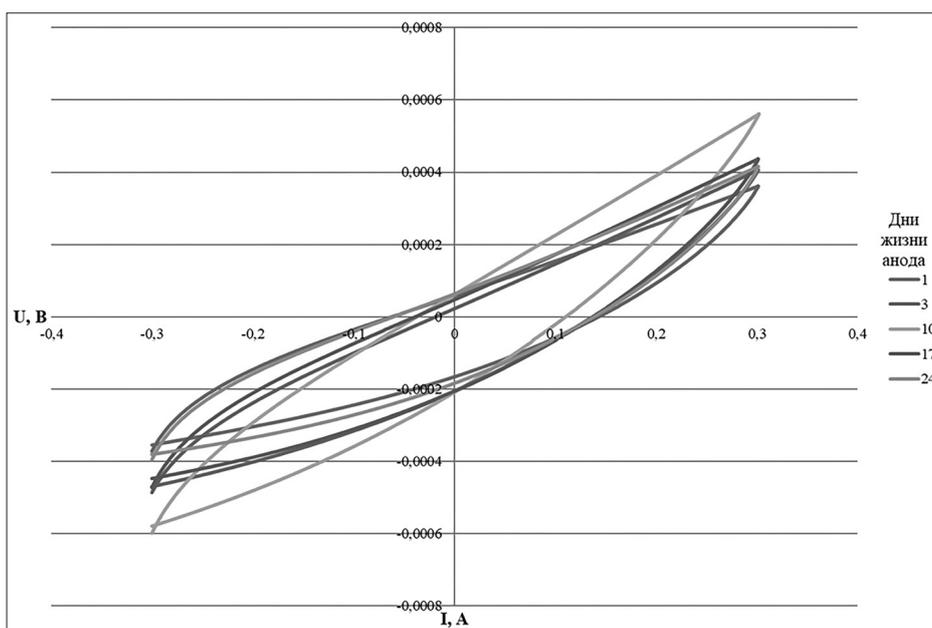


Рис. 1. Зависимость силы тока от разности потенциалов в почвенном МТЭ в 1-, 3-, 10-, 17-, 24-й дни эксперимента

Мощность постоянного тока ячейки рассчитывалась по формуле:

$$P=I \times U,$$

где (P) — мощность, (I) — сила тока, (U) — напряжение.

Электрическая емкость в первый день экспериментов составила 63 мФ/м², затем с течением дней уменьшалась и вновь выросла, достигнув максимума на

17-е сутки проведения эксперимента со значением 65,6 мФ/м² (рис. 2).

Емкость ячейки рассчитывалась по следующей формуле:

$$C=I/(U/dt),$$

где (C) — емкость, (U) — напряжение, (I) — сила тока, а (dt) — время измерения для определенного напряжения.

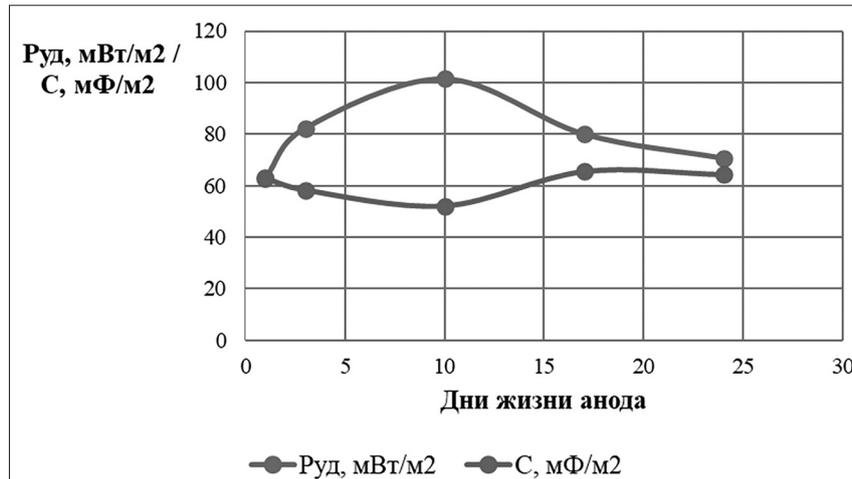


Рис. 2. Зависимости максимальной удельной мощности (синяя линия — вверх) и емкости (красная линия) от времени жизни анода почвенного МТЭ

Результирующие данные приведены в таблице ниже (табл. 1).

Таблица 1

Удельная мощность и емкость ячейки почвенного МТЭ в разные дни жизни анода

День жизни анода	$P_{уд}$, мВт/м ²	C, мФ/м ²
1	62,8	63,0
3	82,2	58,3
10	101,4	52,1
17	79,9	65,6
24	70,6	64,4

Исходя из данных об емкости, видно, что после выдерживания анода в среде X1 и закапывания его в почву на поверхности образуется биопленка бактерий, которая показывает хорошую стабильность работы ячейки почвенного МТЭ.

Заключение

Биопленки бактерий являются энергетически выгодной структурной организацией микроорганизмов, что

служит положительным свойством для применения их в качестве биокатализатора для МТЭ. Результаты проведенного исследования показывают, что данный вариант МТЭ с биопленкой почвенных бактерий на аноде обеспечивает стабильную работу и высокую удельную мощность, достигающую 101,4 мВт/см². Материал электродов, отсутствие мембраны и медиаторов, получение биокатализатора из естественной среды — все это представляет собой неоспоримый плюс данного варианта биотопливного элемента, что экономично сказывается на его стоимости.

Исследуемая ячейка выдавала максимальную выходную мощность 101,4 мВт/м², а максимальную емкость — 65,6 мФ/м². В предыдущих работах изучалась работа МТЭ на основе монокультуры широко известной электрогенной бактерии *Gluconobacter oxydans*. Максимальная удельная мощность в безмембранном МТЭ с графитовыми стержнями в качестве электродов составляла 14,3 мВт/м² [13], а в МТЭ, совмещенном с фотобиореактором, — 92 мВт/м² [1]. Это показывает, что применение в качестве биокатализатора почвенных микроорганизмов, а конкретнее — образование биопленки из них, вызывает интерес для дальнейших исследований по этой теме. Они будут направлены на идентификацию исследуемых почвенных микроорга-

низмов и оптимизацию топливной ячейки для получения больших электрических мощностей.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» в рамках тематического плана 1.11. Разработка природоподобных биоэнергетических и гибридных источников энергии для различных областей применения.

Литература

1. Вишневецкая М.В., Парунова Ю.М., Готовцев П.М., Васильев Р.Г. Применение биоанода на основе *Glucanobacter oxydans* из углеродной ткани в фотобиореакторе для очистки сточных вод // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 4. — С. 17–21.
2. Марданова А.М., Кабанов Д.А., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: Основные принципы организации и методы исследования: учеб. пособие. — Казань: К(П)ФУ, 2016. — 42 с.
3. Alferov V., Vasilov R., Gubin S. The biofuel elements on the basis of the nanocarbon materials // RENSIT. — 2014. — Vol. 6. — P. 187–208.
4. Casula E., Kim B., Chesson H., Di Lorenzo M., Mascia M. Modelling the influence of soil properties on performance and bioremediation ability of a pile of soil microbial fuel cells // *Electrochimica Acta*. — 2021. — Vol. 368. — Art. 137568.
5. Dziegielowski J., Metcalfe B., Di Lorenzo M. Towards effective energy harvesting from stacks of soil microbial fuel cells // *Journal of Power Sources*. — 2021. — Vol. 515. — Art. 230591.
6. Dziegielowski J., Metcalfe B., Villegas-Guzman P., Martínez-Huitle C.A., Gorayeb A., Wenk J., Di Lorenzo M. Development of a functional stack of soil microbial fuel cells to power a water treatment reactor: From the lab to field trials in North East Brazil // *Applied Energy*. — 2020. — Vol. 278. — Art. 137568.
7. Jiang Y.-B., Zhong W.-H., Han C., Deng H. Characterization of electricity generated by soil in microbial fuel cells and the isolation of soil source exoelectrogenic bacteria // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — Vol. 7. — Art. 1776.
8. Kurniawan T.A., Chan G.Y., Lo W.H., Babel S. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals // *Chemical Engineering Journal*. — 2006. — Vol. 118. — No. 1. — P. 83–98.
9. Logan B.E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells // *Nature reviews. Microbiology*. — 2009. — Vol. 7. — No. 5. — P. 375–381.
10. Mustakeem M. Electrode materials for microbial fuel cells: nanomaterial approach // *Materials for Renewable and Sustainable Energy*. — 2015. — Vol. 4. — Art. 22.

11. Nguyen H.-U.-D., Nguyen D.-T., Taguchi K. A portable soil microbial fuel cell for sensing soil water content // *Measurement: Sensors*. — 2021. — Vol. 18. — Art. 100231.
12. Salgueiro J., Pérez L., Maceiras R., Sánchez A., Cancela A. Semicontinuous culture of *Chlorella vulgaris* microalgae for wastewater treatment // *International Journal of Environmental Research*. — 2018. — Vol. 12. — P. 765–772.
13. Vishnevskaya M., Gazizova D., Victorenko A., Konova I. Membraneless microbial biofuel cell for municipal waste water treatment // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. — 2019. — Vol. 337. — Art. 012002.

References

1. Vishnevskaya MV, Parunova YuM, Gotovtsev PM, Vasilov RG. Primeneniye bioanoda na osnove *Glucanobacter oxydans* iz uglevodnoy tkani v fotobioreaktore dlya ochistki stochnykh vod. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova* 2019; 15(4):17–21 (in Russian).
2. Mardanova AM, Kabanov DA, Rudakova NL, Sharipova MR. Bioplenki: Osnovnyye printsiipy organizatsii i metody issledovaniya: ucheb. posobiye. Kazan': K(P)FU, 2016: 42 (in Russian).
3. Alferov V, Vasilov R, Gubin S. The biofuel elements on the basis of the nanocarbon materials. *RENSIT* 2014; 6:187–208.
4. Casula E, Kim B, Chesson H, Di Lorenzo M, Mascia M. Modelling the influence of soil properties on performance and bioremediation ability of a pile of soil microbial fuel cells. *Electrochimica Acta* 2021; 368: 137568.
5. Dziegielowski J, Metcalfe B, Di Lorenzo M. Towards effective energy harvesting from stacks of soil microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 2021; 515: 230591.
6. Dziegielowski J, Metcalfe B, Villegas-Guzman P, Martínez-Huitle CA, Gorayeb A, Wenk J, Di Lorenzo M. Development of a functional stack of soil microbial fuel cells to power a water treatment reactor: From the lab to field trials in North East Brazil. *Applied Energy* 2020; 278: 137568.
7. Jiang Y-B, Zhong W-H, Han C, Deng H. Characterization of electricity generated by soil in microbial fuel cells and the isolation of soil source exoelectrogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 1776.
8. Kurniawan TA, Chan GY, Lo WH, Babel S. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chemical Engineering Journal* 2006; 118(1):83–98.
9. Logan BE. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature reviews. Microbiology* 2009; 7(5):375–381.
10. Mustakeem M. Electrode materials for microbial fuel cells: nanomaterial approach. *Materials for Renewable and Sustainable Energy* 2015; 4: 22.
11. Nguyen H-U-D, Nguyen D-T, Taguchi K. A portable soil microbial fuel cell for sensing soil water content. *Measurement: Sensors* 2021; 18: 100231.

12. Salgueiro J, Pe´rez L, Maceiras R, Sa´nchez A, Cancela A. Semicontinuous culture of *Chlorella vulgaris* microalgae for wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research* 2018; 12:765–772.
13. Vishnevskaya M, Gazizova D, Victorenko A, Konova I. Membraneless microbial biofuel cell for municipal waste water treatment. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 2019; 337: 012002.

MEMBRANELESS BIOFUEL CELL WITH SOIL BACTERIA BIOFILM ANODE

M.V. VISHNEVSKAYA¹, M.P. ZHIYANOVA², D.A. KHARKOV³,
P.M. GOTOVTSEV¹, Yu.M. PARUNOVA¹, R.G. VASILOV¹

¹*National Research Centre «Kurchatov Institute»,*

²*Lomonosov Moscow State University,*

³*Moscow Polytechnic University, Moscow*

One of the most important issues of modern science is the development of alternative energy sources. Biofuel cells are an integral part of the development of the industry in this area. Soil microbial fuel cells (MFC) are of particular interest today. The soil is rich in various microorganisms that are able to combine into biofilms. They are capable of generating high electricity. Soil MFC can be used for bioremediation of soil from organic pollutants, as well as for water purification. In this article an MFC with a bioanode was investigated. The anode was a graphite tissue with a biofilm of soil bacteria grown on it. This is achieved by soaking the anode in a rich nutrient medium. After that it was placed in the soil for a day. The obtained maximum output power is 101.4 mW/m² and the maximum electrical capacity is 65.6 mF/m². The biofuel cell was membraneless and mediatorless. It made the cost is low. Thus, soil MFC is a promising direction in the study of alternative bioenergy.

Keywords: microbial fuel cell, biofilm of soil bacteria, graphite cloth.

Address:

Vishnevskaya M.V.

Junior Researcher, Department of Biotechnology and Bioenergy,

National Research Centre «Kurchatov Institute»

E-mail: Vishnevskaya_MV@nrcki.ru

Для цитирования:

Вишневецкая М.В., Жиянова М.П., Харьков Д.А., Готовцев П.М., Парунова Ю.М., Василов Р.Г. Безмембранный биотопливный элемент с анодом с биопленкой почвенных бактерий. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2021; 17(4):6–10.

For citation:

Vishnevskaya M.V., Zhiyanova M.P., Kharkov D.A., Gotovtsev P.M., Parunova Yu.M., Vasilov R.G. Membraneless biofuel cell with soil bacteria biofilm anode. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(4):6–10 (in Russian).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА

В.В. ВОЛОДИН^{1*}, Н.Н. ШЕРГИНА^{1,2}, В.В. МАРТЫНОВ¹, С.О. ВОЛОДИНА¹,
А.А. ШУБАКОВ¹, Е.Ю. КОЖЕВНИКОВА³, Т.И. ШИРШОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ⁴

¹Институт биологии Коми научного центра УрО РАН,

²ФГБУ ВО «Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина», Сыктывкар;

³Российский государственный университет нефти и газа (национальный исследовательский университет) им. И.М. Губкина,

⁴Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

На основании ростовых характеристик дереворазрушающих грибов, их избирательного действия на отдельные компоненты лигноцеллюлозы и сравнительного изучения активности целлюлолитических и лигнолитических ферментов дана биотехнологическая оценка их применения в качестве биологических агентов в процессах предварительной делигнификации древесного сырья и осахаривания целлюлозы на ключевой стадии ферментативного гидролиза при получении биоэтанола. Выявлено, что наибольшей способностью к деструкции лигнина обладает гриб *Coriolus hirsutus* LE-074 (син. *Trametes hirsuta*), который к 28-м суткам ферментации усваивал 33,3% лигнина при культивировании на березовых опилках. Два штамма *Trametes hirsuta* 24.24 и 17.24 обладают наиболее высокой активностью окислительных ферментов лигнин-пероксидазы и лакказы при культивировании на еловых опилках. Наибольшей целлюлолитической активностью и сбалансированностью состава целлюлазы по отношению к ферментативному гидролизу целлюлозы обладают штаммы гриба *Fomitopsis pinicola*, которые по своей способности к осахариванию целлюлозы сравнимы с промышленными штаммами гриба рода *Trichoderma*.

Ключевые слова: дереворазрушающие грибы, лигноцеллюлоза, древесина, целлюлазы, лигниназы, ферментативный гидролиз, биоэтанол, биотопливо.

Введение

Лигноцеллюлоза является наиболее перспективным источником возобновляемого сырья при производстве биотоплива второго поколения. Производство биоэтанола из непищевого лигноцеллюлозного сырья может решить проблему возрастающего спроса на энергию, а также сократить выбросы парниковых газов, способствовать комплексному использованию отходов лесной, деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности и сельского хозяйства. Одним из многообещающих биотехнологических подходов к получению «целлюлозного» этанола является фермен-

тативный гидролиз целлюлозы до глюкозы в качестве ключевой промежуточной стадии [4, 5, 9, 21, 23, 24].

Несмотря на то, что научные основы ферментативного гидролиза целлюлозы уже хорошо изучены, существует ряд трудностей для широкого внедрения этой технологии в практику [3, 8, 27]. В мировой практике известны примеры уже действующих заводов по получению биоэтанола с участием ферментов, однако разработанные промышленные процессы ориентированы на использование сельскохозяйственных отходов (соломы, рисовой шелухи, багассы сахарного тростника) или специально выращиваемых для этих целей энергетических культур (канарского тростника, мискантуса и других). Во всех перечисленных случаях используется биомасса травянистых растений, которая относительно легко подвергается делигнификации для повышения ее реакционной способности к ферментативному гидролизу [5, 28]. У древесных растений лигноуглеводный комплекс является намного более прочным, что служит одним из главных препятствий для использования древесных отходов с целью получения биоэтанола биотехнологическим путем.

© 2021 г. Володин В.В., Шергина Н.Н., Мартынов В.В., Володина С.О., Шубаков А.А., Кожевникова Е.Ю., Ширшова Т.И., Васильев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Володин Владимир Витальевич

доктор биологических наук, зав.лабораторией Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН)

E-mail: vladimir131035@yandex.ru

В природе встречается большое количество бактерий, микро- и макромицетов, способных разрушать целлюлозу до глюкозы за счет действия целлюлолитических ферментов. Бактерии характеризуются более высокой скоростью роста, однако дереворазрушающие грибы обладают повышенной проникающей способностью в древесный субстрат, а также являются эффективными деструкторами не только целлюлозы, но и лигнина [1, 22], что должно позитивно сказываться на реакционной способности лигноцеллюлозы древесины к ферментативному гидролизу.

Ранее в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН проводились многолетние исследования по получению белково-углеводных кормовых добавок для жвачных животных путем твердофазной ферментации лигноцеллюлозного вторичного сырья (опилки) дереворазрушающими грибами и изучению их переваримости и кормовой ценности [3], а также по получению полиферментных препаратов, содержащих целюлазы, для обработки трудноусвояемых компонентов растительных кормов для птиц и моногастричных животных [14].

В связи с возрастанием интереса к использованию лигноцеллюлозы в качестве субстрата для получения биоэтанола целью настоящей работы является оценка возможности биотехнологического использования высших дереворазрушающих грибов для предварительной делигнификации и повышения реакционной способности древесного сырья к ферментативному гидролизу (био-палпинг), а также получения ферментных препаратов целлюлазного комплекса для ферментативного гидролиза или прямого микробиологического осахаривания древесины для последующего сбраживания глюкозы и получения очищенного биоэтанола.

Материалы и методы

Были использованы штаммы дереворазрушающих базидиальных грибов *Coriolus hirsutus* LE-074 (*Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd 1924) (кориолус волосистый), *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm 1871 (вешенка обыкновенная) и *Kuehneromyces mutabilis* (Schaeff.) Singer & A.H. Sm. 1946 0726 (опёнок летний), полученные из коллекции высших грибов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН в 1986 г., а также штамм *Panus tigrinus* 8/18 (*Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. 1825) (пилолистник тигровый) из коллекции Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (г. Пущино Московской обл., 1986 г.). Культура *Fomitopsis*

pinicola (трутовик окаймленный) была выделена Э.Н. Ануфриевой из плодовых тел, собранных в окрестностях г. Сыктывкар в 1987 г. *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd 1924 (трутовик жестковолосистый), штаммы 24.24 и 17.24; *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst 1881 (трутовик окаймленный), штамм 5.21; *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill 1920 (трутовик серно-желтый) 11.01 были переданы для исследования из Российского государственного университета нефти и газа (национальный исследовательский университет) им. И.М. Губкина в 2018 г.

Субстратом служили березовые, осиновые и еловые опилки (размер частиц до 10 мм), которые увлажняли питательной средой (3,5 мл/г субстрата) следующего состава, %: K_2HPO_4 – 0,7; KH_2PO_4 – 0,3; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01; KCl – 0,005; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,001; $ZnSO_4 \times 5H_2O$ – 0,001; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,3.

Для интенсификации роста грибов в условиях твердофазной ферментации (ТФФ) вносили солодовую муку в количестве 5% от массы опилок. Влажность полученного субстрата 75–80%. В качестве посевного материала использовали трех-четырёхсуточный мицелий грибов, выращенный глубинным культивированием (ГК) на среде следующего состава, %: глюкоза – 2; пептон – 0,3; солод – 0,5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,05; KH_2PO_4 – 0,06; K_2HPO_4 – 0,4; $CaCl_2 \times H_2O$ – 0,005; pH=5,5. Инокулят вносили в количестве 10% (по объему), перемешивали с субстратом и выращивали при $t=27-28$ °C без принудительной аэрации в течение 1–1,5 месяцев. Анализ продуктов ферментации проводили в динамике с интервалом 7 суток. Потерю органического вещества оценивали, взвешивая высушенные при $t=105$ °C образцы в начале и по окончании процесса твердофазной ферментации. В воздушно-сухих контрольных и ферментированных опилках определяли содержание лигнина и целлюлозы. Содержание лигнина устанавливали весовым методом после гидролиза измельченных субстратов смесью концентрированных соляной и серной кислот. Целлюлозу определяли антроновым методом в разбавленных гидролизатах (калибровочную кривую строили по глюкозе). В экстрактах определяли содержание редуцирующих сахаров по методу Шомоди – Нельсона [3].

Динамику активности внеклеточных ферментов изучали в течение 14 суток культивирования. Активность эндо-1,4-β-глюканазы (КФ-3.2.1.4) определяли по скорости начального уменьшения вязкости 0,3%-ного раствора карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) при $t=40$ °C, pH=4,0 и выражали в мкМ/мин×мл. Сум-

марную способность комплекса целлюлаз к осахариванию КМЦ (КМЦ-активность) оценивали по накоплению восстанавливающих сахаров в реакционной смеси, содержащей 4,0 мл 0,3%-ного раствора КМЦ и 1,0 мл культурального фильтрата (КФ) или экстракта после твердофазной ферментации, за 1 ч при $t=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=4,0$ и выражали в $\text{мкМ}/\text{мин}\times\text{мл}$ (МЕ — международные единицы) в пересчете на глюкозу.

В экспериментах по определению активности лигнолитических ферментов грибы-продуценты выращивали при температуре $26\text{--}28\text{ }^{\circ}\text{C}$ обоими способами: ГК и ТФФ. ГК проводили в колбах Эрленмейера на шейкере-инкубаторе при 120 об/мин, ТФФ — на чашках Петри стационарно. Все емкости содержали лигнин в составе еловых и березовых опилок, опилки увлажняли питательной средой Норкранс (влажность субстрата: $70\text{--}75\%$). В отобранных пробах культуральной жидкости и фильтратах (при ТФФ) определяли активность ферментов лигнин-разрушающего комплекса: лигнин-пероксидазы (ЛП: КФ 1.11.1.14), марганецпероксидазы (МпП: КФ 1.11.1.13), лакказы (ЛК: КФ 1.10.3.2).

Посевным материалом служили 72-часовые суспензии биомассы грибов, выращенных глубинным способом на 8%-ном пивном сусле ($\text{pH}=6$) при температуре $25\text{--}26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед засевом инокулят измельчали фарфоровыми бусами 20 мин при 180 об/мин до образования однородной суспензии, которую в объеме 10% стерильно вносили в колбы или чашки Петри для культивирования.

Активность лигнин-пероксидазы оценивали на спектрофотометре СФ-26 при $\lambda=310\text{ нм}$ по скорости окисления красителя Азура В [16, 17], активность марганецпероксидазы — при $\lambda=610\text{ нм}$ с добавлением в реакционную смесь сульфата марганца по скорости окисления фенолового красного [25]; активность лакказы — при $\lambda=450\text{ нм}$, в качестве реагента использовали гваякол [18]. За условную единицу исследуемых активностей ферментов принимали увеличение оптической плотности на 0,1 единицу в 1 мл реакционной среды за 1 мин. ($0,1\text{ ед}/\text{мин}\times\text{мл}$). Активность внеклеточных ферментов определяли на 3, 5, 7, 10, 14-е сутки при ГК и на 7, 10, 14, 18, 21-е при ТФФ.

В экспериментах по оптимизации биосинтеза целлюлаз дереворазрушающим грибом *F. pinicola*, штамм 5.21 гриб культивировали на среде Норкранс (г/л): глюкоза — 10 г; аммоний виннокислый — 1 г; KH_2PO_4 — 1 г; $\text{MgSO}_4\times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 г; железо лимоннокислое — 5 мг; $\text{ZnSO}_4\times 7\text{H}_2\text{O}$ — 4,4 мг; MnSO_4 — 5 мг; CaCl_2 — 55,5 мг; витамин B_1 — 40 мг. В многофакторном экс-

перименте при ГК вместо глюкозы использовали опилки лиственных пород деревьев. Условия культивирования: ГК проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, 50 мл рабочей среды, 1,5 г опилок. Культивировали в течение 14 суток на шейкере при $120\text{--}130\text{ об}/\text{мин}$. при температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; ТФФ проводили в чашках Петри, масса опилок 4 г, увлажнение $70\text{--}75\%$. Культивировали в течение 14 суток стационарно. Посевной материал — мицелий гриба, выращенный в течение 14 дней методом ГК на 8%-ном пивном сусле ($\text{pH}=5$) при температуре $25\text{--}26\text{ }^{\circ}\text{C}$. Количество инокулята — 5 мл. В отобранных пробах культуральной жидкости (при ГК) и фильтратах (при ТФФ) определяли активность ферментов целлюлазного комплекса.

Определение общей целлюлазной активности проводили по осахариванию фильтровальной бумаги [13]. Целлюлолитическую активность выражали в мг глюкозы, образующейся в реакционной смеси при действии на субстрат 1 мл культуральной жидкости.

Все эксперименты проводили в трех биологических и аналитических повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010.

Для оптимизация компонентов питательной среды при глубинном культивировании *Fomitopsis pinicola* использовали метод многофакторного эксперимента. Полный факторный эксперимент (ПФЭ) 4^2 был выполнен согласно методике [2].

Каждый фактор оптимизации (концентрация компонентов среды) варьировал на двух уровнях: максимальном и минимальном (табл. 1). Были подобраны восемь вариантов среды для культивирования гриба *Fomitopsis pinicola*. Опыт проводился в двух повторностях для каждого варианта. Расчет и оценка значимости регрессионных коэффициентов проводилась согласно методу Бокса — Уилсона.

При анализе коэффициентов уравнения регрессии учитывали их влияние на параметр оптимизации (ФБ-активность): если коэффициенты при факторах (b) имеют отрицательный знак, то факторы оказывают негативное воздействие, и при увеличении фактора параметр оптимизации будет снижаться. Если коэффициенты имеют положительный знак, то факторы оказывают положительное воздействие на параметр оптимизации, и при увеличении фактора параметр оптимизации будет возрастать [2]. Величина коэффициента соответствует вкладу данного фактора в величину параметра оптимизации при переходе фактора с нулевого уровня на верхний или нижний (максимальный/минимальный).

Матрица многофакторного эксперимента по подбору условий культивирования *Fomitopsis pinicola*

Уровни и интервалы варьирования факторов	Факторы (концентрация компонентов среды)				
	1 (b1) Опилки, г	2 (b2) аммоний виннокислый, мг/мл	3 (b3) KH ₂ PO ₄ , мг/мл	4 (b4) MgSO ₄ ×7H ₂ O, мг/мл	
Основной уровень (S _j) ₀	2,5	0,05	0,05	0,025	
Максимальный уровень (S _j) _{max}	5	0,1	0,1	0,05	
Минимальный уровень (S _j) _{min}	0	0,0	0,0	0,0	
Интервал варьирования λ _i	1	0,02	0,02	0,01	
Матрица планирования эксперимента	№ варианта				
	1	(-) 1,5	(-) 0,03	(-) 0,03	(-) 0,015
	2	(+) 3,5	(-) 0,03	(-) 0,03	(+) 0,035
	3	(-) 1,5	(+) 0,07	(-) 0,03	(+) 0,035
	4	(+) 3,5	(+) 0,07	(-) 0,03	(-) 0,015
	5	(-) 1,5	(-) 0,03	(+) 0,07	(+) 0,035
	6	(+) 3,5	(-) 0,03	(+) 0,07	(-) 0,015
	7	(-) 1,5	(+) 0,07	(+) 0,07	(-) 0,015
8	(+) 3,5	(+) 0,07	(+) 0,07	(+) 0,035	

Значимость коэффициентов уравнения регрессии определяли по дисперсии воспроизводимости процесса (σ^2) и доверительному интервалу (ε).

Дисперсию воспроизводимости (σ^2) определяли по формуле:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{u=1}^N \sum_{j=1}^{\gamma} (P_j - \bar{P})^2}{(\gamma - 1)N},$$

где P_j — значение ФБ-активности культуральной жидкости, полученное в каждом варианте серии; \bar{P} — среднее значение ФБ-активности культуральной жидкости, полученное при культивировании на одинаковой среде; g — количество одинаковых сред (повторных серий); N — количество вариантов.

Доверительный интервал (ε) определяли по формуле:

$$\varepsilon = t \sqrt{\frac{\sigma^2}{N\gamma}} = t \sqrt{\frac{\sum \sum (P_u - \bar{P})^2}{(\gamma - 1)N^2\gamma}},$$

где t — значение критерия Стьюдента.

Результаты

1. Изучение расщепления лигноцеллюлозного комплекса древесины дереворазрушающими грибами. Было показано, что изученные в эксперименте штаммы дереворазрушающих грибов: *P. tigrinus* 8/18,

Pl. ostreatus и *C. hirsutus* ЛЕ-074, способны ассимилировать компоненты древесины березовых опилок. Активный рост грибов *P. tigrinus* 8/18 и *C. hirsutus* ЛЕ-074 отмечен через 2–3 суток после посева. Культура *Pl. ostreatus* имела более длительный lag-период, активная колонизация началась на 4–5-е сутки культивирования. Разрушение органического вещества субстрата грибом *C. hirsutus* на протяжении всего процесса твердофазной ферментации было большим, чем грибами *P. tigrinus* и *Pl. ostreatus*, у которых динамика изменения данного показателя оказалась сходной (рис. 1). При совместной ферментации опилок грибами *C. hirsutus* и *Pl. ostreatus* отмечалась наибольшая потеря органического вещества субстрата (29%). Во всех ферментациях разрушение органического вещества опилок продолжалось вплоть до 5-й недели культивирования.

Анализ подвергнутого биодеструкции лигноцеллюлозного комплекса березовых опилок продемонстрировал, что все грибы разлагали как лигниновый, так и целлюлозный компоненты субстрата (рис. 2, 3). Заметная деградация лигнина в опилках, ферментированных грибом *C. hirsutus*, наблюдалась уже на 7-е сутки роста, к 28-м суткам ферментации гриб усваивал 33,3% лигнина субстрата. Менее интенсивно лигнин березовых опилок разлагали *P. tigrinus* и *Pl. ostreatus*, тем не менее к концу ферментации деструкция его составила соответственно 20,2 и 27,0%.

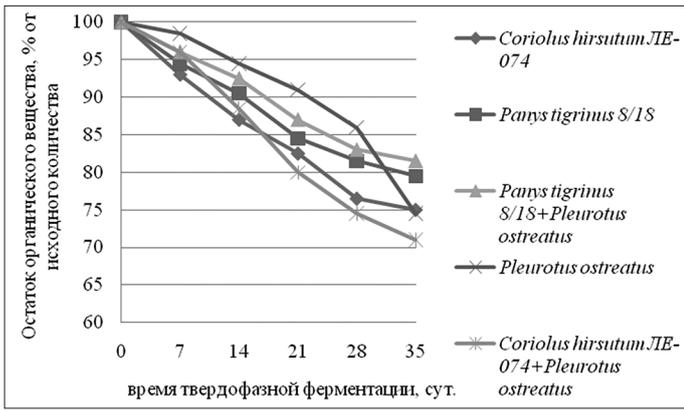


Рис 1. Динамика разрушения органического вещества березовых опилок в процессе твердофазной ферментации базидиомицетами

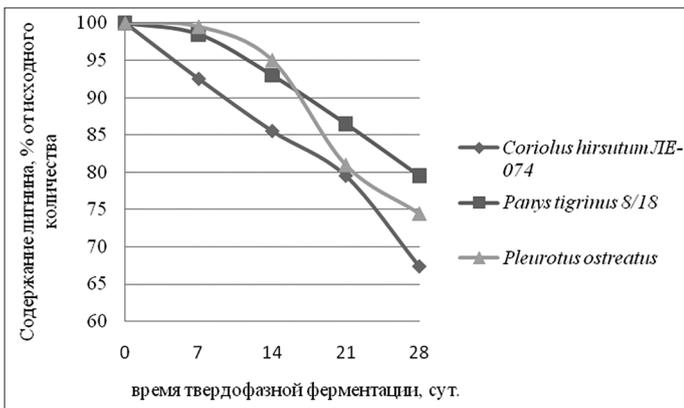


Рис 2. Динамика деградации лигнина в процессе твердофазной ферментации березовых опилок дереворазрушающими грибами

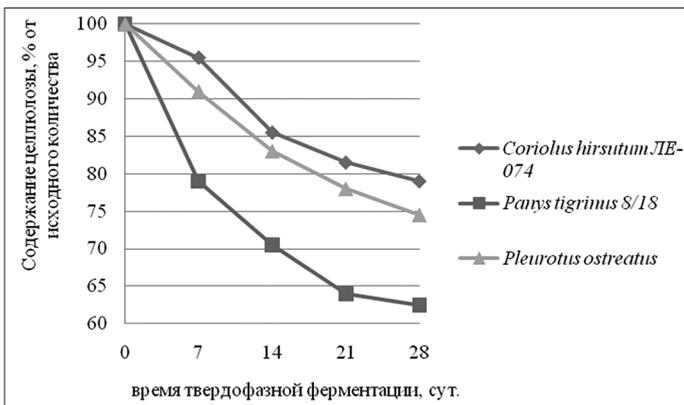


Рис 3. Динамика деградации целлюлозы при твердофазной ферментации березовых опилок дереворазрушающими грибами

P. tigrinus наиболее активно разрушал целлюлозный компонент опилок — на 21-е сут ферментации потеря целлюлозы достигла 35,5%. К этому сроку убыль целлюлозы в опилках, ферментированных грибами *Pl. ostreatus* и *C. hirsutus*, составила соответственно 26,0 и 19,5%

Рост грибов на березовых опилках сопровождался изменением содержания редуцирующих сахаров в продуктах ферментации (рис. 4). В начале ферментации общее их содержание в субстрате составило 39 мг/г субстрата. У всех грибов наблюдали резкое снижение количества свободных углеводов в начальный период ферментации в результате их активного потребления растущими культурами. На 14-е сутки у грибов *C. hirsutus* и *Pl. ostreatus* процесс стабилизировался, и до конца ферментации концентрация редуцирующих сахаров поддерживалась на относительно постоянном уровне. У гриба *P. tigrinus* на 21-е сутки ферментации концентрация свободных сахаров возрастала, что совпадает с периодом максимальной деструкции этим грибом целлюлозного компонента опилок. Очевидно, на этом этапе конверсия целлюлозы до свободных углеводов превышает их потребление грибом, в результате субстрат обогащается легкоусвояемыми редуцирующими сахарами.

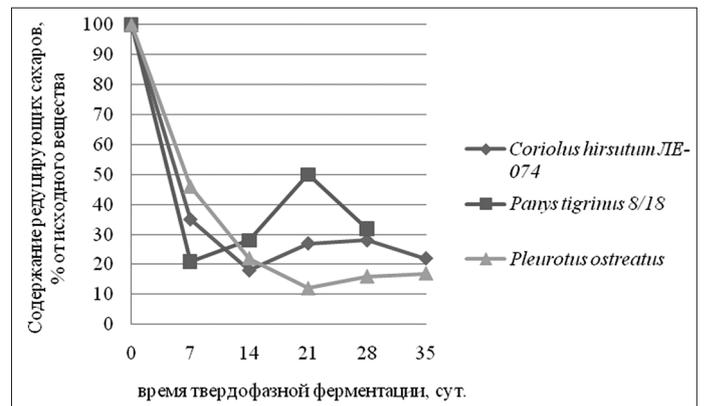


Рис 4. Динамика содержания редуцирующих сахаров в процессе твердофазной ферментации березовых опилок дереворазрушающими грибами

2. Активность целлюлолитических ферментов дереворазрушающих грибов при их культивировании на различных отходах древесины. Высшие дереворазрушающие грибы представляют интерес как продуценты целлюлолитических и лигнолитических ферментов. Показана возможность получения препаратов целлюлаз из грибов *Fomitopsis pinicola* и *Phellinus igniarius* [11], а также из других видов грибов [26]. Дереворазрушающие грибы — возбудители белой гнили, обладают уникальной способностью осуществлять полную деградацию лигнина, благодаря наличию у них системы окислительно-восстановительных ферментов, в первую очередь, пероксидазы и фенолоксидаз [6, 7].

Нами изучена способность к продуцированию внеклеточных целлюлаз в условиях глубокой, поверхностной и твердофазной ферментации у трех видов грибов:

P. tigrinus 8/18, *S. hirsutus* ЛЕ-074 и *F. pinicola*. Было установлено, что активности целлюлазных комплексов зависят от типа субстрата и способа культивирования грибов-продуцентов (табл. 2).

Самые высокие показатели активностей эндо-1,4- β -глюканазы и β -глюкозидазы у всех грибов

наблюдаются в условиях твердофазного культивирования. При этом в этих условиях гриб *S. hirsutus* проявлял также максимальную способность к гидролизу нерастворимой целлюлозы (ФБ-активность) и водорастворимой карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ-активность).

Таблица 2

Активности внеклеточных целлюлаз грибов в зависимости от типа субстрата и способа культивирования

Субстрат	Способ культивирования	ФБ-активность, мкМ/ч×мл	КМЦ-активность, мкМ/мин×мл	Эндо-1,4- β -глюканаза, мкМ/мин×мл	β -глюкозидаза, мкМ/мин×мл
<i>Ranys tigrinus</i> 8/18					
Еловые опилки	ПК	0,23	0,007	0,03	0,03
	ГК	0,15	0,060	0,26	0,21
	ТФФ	0,08	0,040	5,50	1,75
Березовые опилки	ПК	0,21	0,010	0,02	0,06
	ГК	0,35	0,002	0,13	0,27
	ТФФ	0,22	0,420	2,15	1,37
Осиновые опилки	ПК	0,44	0,00	0,03	0,03
	ГК	0,14	0,02	0,42	0,60
	ТФФ	0,31	0,04	12,8	1,57
<i>Coriolus hirsutum</i> ЛЕ-074					
Еловые опилки	ПК	0,11	0,009	0,02	0,27
	ГК	0,18	0,002	0,25	0,24
	ТФФ	0,64	0,040	16,40	2,04
Березовые опилки	ПК	0,18	0,007	0,02	0,25
	ГК	0,20	0,007	0,08	0,14
	ТФФ	0,38	0,020	3,45	2,55
Осиновые опилки	ПК	0,18	0,009	0,03	0,29
	ГК	0,25	0,020	0,39	0,25
	ТФФ	0,34	0,090	12,00	1,08
<i>Fomitopsis pinicola</i>					
Еловые опилки	ПК	0,27	0,020	0,55	0,28
	ГК	0,03	0,003	0,07	0,25
	ТФФ	0,04	0,060	18,80	7,49
Березовые опилки	ПК	0,45	0,080	0,95	0,28
	ГК	0,04	0,004	0,04	0,18
	ТФФ	0,04	0,090	22,00	8,00
Осиновые опилки	ПК	0,22	0,02	5,70	0,33
	ГК	0,20	0,01	0,07	0,22
	ТФФ	0,35	0,01	24,10	6,70

При глубинном и поверхностном культивировании (ПК) грибов с целью биосинтеза целлюлаз полученные результаты существенно зависели от физиологических особенностей у грибов различных видов. У *P. tigrinus* 8/18 на всех типах субстрата активность и располагалась в ряду ТФФ>ГК>ПК. Распределение активностей этих ферментов в культуре *S. hirsutus* ЛЕ-074 было иным: эндо-1,4- β -глюканаза — ТФФ>ГК>ПК, β -глюкозидаза — ТФФ>ПК>ГК. При выращивании *F. pinicola* активность обоих ферментов независимо от типа субстрата была минимальной в глубинной культуре.

Способность комплекса целлюлаз всех трех культур к осахариванию нерастворимой целлюлозы и растворимой КМЦ сравнительно невелика (табл. 2). Самым

активным продуцентом эндо-1,4- β -глюканаза (рис. 5) и β -глюкозидазы (рис. 6) оказался *F. pinicola*.

Активность внеклеточных целлюлаз зависела от использованного питательного субстрата. Наиболее эффективным для продуцирования ферментов грибом *P. tigrinus* оказались осинные опилки, грибом *S. hirsutus* — еловые. Близкие по величине активности внеклеточных целлюлаз получены в культуре *F. pinicola* на всех трех типах субстрата (табл. 2). Очевидно, способность к продуцированию целлюлазных комплексов у исследованных базидиальных грибов определяется их экологической приуроченностью — в природе они поражают преимущественно древесину хвойных или лиственных пород, либо, как в случае *F. pinicola*, с равным успехом поражают любой древесный субстрат.

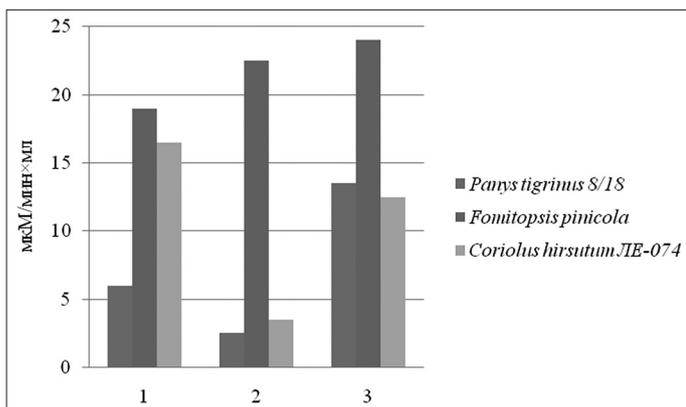


Рис 5. Активность эндо-1,4-β-глюканазы в твердофазных культурах на среде с еловыми (1), березовыми (2) и осиновыми (3) опилками

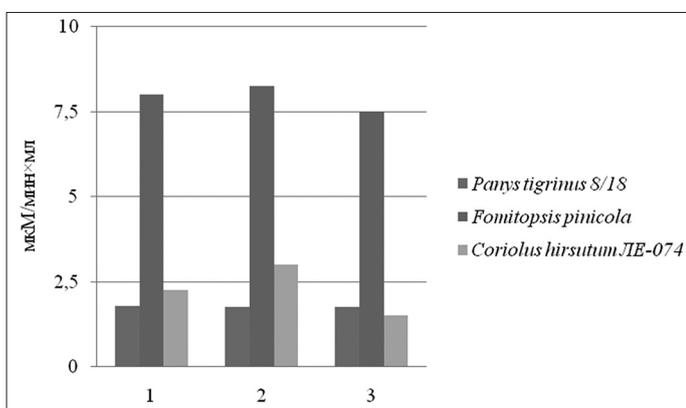


Рис 6. Активность β-глюкозидазы в твердофазных культурах на среде с еловыми (1), березовыми (2) и осиновыми (3) опилками

Таким образом, самым перспективным продуцентом целлюлаз оказался гриб *F. pinicola*, который на всех типах субстрата проявлял максимальные активности эндо-1,4-β-глюканазы (19–24 МЕ), β-глюкозидазы (7–8 МЕ), а также комплекса ферментов, осаживающих фильтровальную бумагу (0,35 МЕ). При твердофазной ферментации опилок *F. pinicola* активности ферментов были сравнимы с таковыми у грибов рода *Trichoderma* — активных продуцентов целлюлаз.

3. Активность лигнолитических ферментов дереворазрушающих грибов при глубинном и твердофазном культивировании на различных отходах древесины. Разрушение целлюлозы и лигнина — это сложный многоэтапный процесс, который зависит от набора экзоферментов, их удельной и абсолютной активности. Базидиальные дереворазрушающие грибы являются практически единственными организмами, способными разрушать лигнин благодаря мощной полиферментной системе. Основными ферментами, участвующими в про-

цессе биоразложения лигнина базидиальными грибами, являются лигнин-пероксидаза, марганец-пероксидаза и лакказы. Неспецифичность мультиферментного комплекса лигнолитического действия и их высокая окислительная способность открывают широкие возможности для использования грибов-лигнолитиков и их лигнолитических ферментов при детоксификации и деградации ксенобиотиков, биоремедиации почв и вод, детоксикации фенольных соединений и альдегидов [10, 15].

Была исследована активность внеклеточных лигниназ (лигнин-пероксидазы, марганец-пероксидазы, лакказы) у четырех штаммов дереворазрушающих макромрицетов: *T. hirsuta* штаммы 24.24; 17.24; *F. pinicola* штамм 5.21; *L. sulphureus* штамм 11.01 в условиях глубинного (ГК) и твердофазного культивирования (ТФК).

Показано, что на активность ферментов лигнин-деградирующего комплекса оказывает влияние тип субстрата, способ культивирования, видо- и штаммоспецифичные особенности дереворазрушающих грибов (табл. 3). Самые высокие значения активности лигнин-пероксидазы (ЛП) и марганец-пероксидазы (МнП) отмечены у штаммов *T. hirsuta*, *F. pinicola* в условиях ТФК на 21-е сутки. Высокие значения активности лакказы (ЛК) *T. hirsuta* (шт. 17.24) отмечены в условиях ГК на 14-е сутки; ЛП у *L. sulphureus* — в условиях ГК на 5-е сутки, МнП — в условиях ТФК на 14-е сутки, ЛК — на 18-е сутки (табл. 3). Все изучаемые штаммы дереворазрушающих базидиомицетов проявляли высокую активность экзоферментов лигниндеградирующего комплекса в условиях глубинного выращивания на 5–14-е сутки, а при твердофазном культивировании — на 14–21-е сутки.

Биохимические и физиологические особенности изучаемых ксилотрофных грибов определяли значения активности ферментов лигнин-деградирующего комплекса при глубинном и твердофазном культивировании. У *T. hirsuta* 24.24 на активность ферментов лигнин-разрушающего комплекса в условиях ГК на еловых опилках можно расположить в ряд: ЛК > ЛП > МнП, в условиях ТФК — ЛП > ЛК > МнП; на березовых опилках в условиях ГК — ЛП > ЛК > МнП, в условиях ТФК — ЛП > МнП > ЛК. Следует отметить, что максимальную активность ферментов при ГК отмечали на 14-е сутки, а при ТФК — на 21-е сутки культивирования. Активность марганец-пероксидазы при культивировании на еловых и березовых опилках была в 3–4 раза, а лигнин-пероксидазы в 1,5 раза ниже при ГК, чем при ТФК. На активность лакказы *T. hirsuta* 24.24 способ культивирования и тип субстрата влияния не оказывали.

Таблица 3

Максимальные активности внеклеточных лигниназ грибов в зависимости от типа субстрата и способа культивирования

Субстрат	Способ культивирования	Лакказы, усл. ед/мл×мин	Марганец-пероксидаза, усл. ед/мл×мин	Лигнин-пероксидаза, усл. ед/мл×мин
<i>Trametes hirsuta</i> штамм 24.24				
Еловые опилки	ГК	16,65 (14)	4,55 (14)	14,83 (14)
	ТФФ	12,52 (21)	11,79 (21)	25,18 (21)
Берёзовые опилки	ГК	9,76 (14)	3,80 (14)	13,47 (14)
	ТФФ	10,27 (21)	11,25 (21)	23,42 (21)
<i>Trametes hirsuta</i> штамм 17.24				
Еловые опилки	ГК	10,20 (14)	3,32 (14)	13,53 (14)
	ТФФ	9,19 (21)	10,47 (21)	28,33 (21)
Берёзовые опилки	ГК	9,85 (14)	3,15 (14)	11,49 (14)
	ТФФ	7,01 (21)	9,28 (21)	24,32 (21)
<i>Fomitopsis pinicola</i> штамм 5.21				
Еловые опилки	ГК	6,68 (14)	3,36 (14)	12,35 (14)
	ТФФ	3,87 (21)	8,66 (21)	17,32 (21)
Берёзовые опилки	ГК	1,98 (14)	3,02 (14)	10,36 (14)
	ТФФ	3,05 (21)	8,35 (21)	16,48 (21)
<i>Laetiporus sulphureus</i> штамм 11.01				
Еловые опилки	ГК	0,13 (10)	0,08 (5)	0,25 (5)
	ТФФ	1,58 (18)	0,75 (14)	0,02 (10)
Берёзовые опилки	ГК	0,76 (7)	0,54 (14)	0,32 (5)
	ТФФ	2,61 (18)	0,84 (14)	0,03 (10)

Примечание: в скобках указаны сутки, когда была отмечена максимальная активность

Изменение активности исследуемых ферментов в культуре *T. hirsuta* 17.24 на еловых и берёзовых опилках в условиях ГК было следующим: ЛП>ЛК>МнП, в условиях ТФК — ЛП>МнП>ЛК. Так же, как и у *T. hirsuta*, штамм 24.24 при культивировании штамма 17.24 на еловых и берёзовых опилках активность марганец-пероксидазы была в 3 раза, а лигнин-пероксидазы в 2 раза ниже при ГК, чем при ТФК. Активность лакказы значительно не различалась при различных способах культивирования на разных опилках.

При выращивании *F. pinicola* активность исследуемых ферментов на берёзовых опилках в условиях ГК и ТФК, на еловых опилках при ТФК изменялась следующим образом: ЛП>МнП>ЛК; на еловых опилках при ГК — ЛП>ЛК>МнП. В комплексе разрушающих ферментов *F. pinicola* наиболее высокие значения активности отмечены у лигнин-пероксидазы при ТФК независимо от типа субстрата, марганец-зависимая пероксидаза также была более активна при ТФК. Лакказная активность была в 1,5 раза выше при ГК и ниже при ТФК на еловых опилках.

L. sulphureus при разных видах культивирования показал самые низкие значения активности ферментов лигнин-деградирующего комплекса. Активность ферментов при ГК на еловых опилках снижалась в ряду ЛП>ЛК>МнП, при ГК на берёзовых опилках и при ТФК на еловых и берёзовых опилках — ЛК>МнП>ЛП. Отмечено, что активность лигнин-пероксидазы *L. sulphureus* при ГК на еловых и берёзовых опилках была на порядок выше, чем при ГК, а активность лакказы, наоборот, при ТФК. На активность лигнин-разрушающих ферментов изучаемого штамма большое влияние оказывал тип субстрата, на берёзовых опилках активность исследуемых ферментов была выше, чем при культивировании на еловых опилках.

Таким образом, для большинства исследуемых штаммов ксилотрофных базидиомицетов оптимальными условиями для проявления активности ферментов лигнин-разрушающего комплекса является субстрат — еловые опилки и условия твердофазной ферментации. По мнению В.А. Мухина [12], грибы, распространенные в хвойных лесах Северного полушария, эволюционно возникли в районах распространения хвойных, либо

быстро их освоили в силу лучшей приспособленности. *L. sulphureus* отличается быстрым во времени выходом на максимальные значения активности ферментов, но низкими абсолютными значениями по сравнению с другими грибами-продуцентами, а также отмечено предпочтение к древесине лиственных пород деревьев. Это связано с его биологической приуроченностью как факультативного сапротрофа и физиолого-биохимическими особенностями как макромицета бурой гнили.

4. Оптимизация биосинтеза целлюлаз дереворазрушающим грибом *Fomitopsis pinicola*, штамм 5.21 при глубинном культивировании на опилках лиственных пород деревьев. Вопросам повышения активности целлюлолитических ферментов для осахаривания целлюлозы при культивировании в регулируемых условиях в настоящее время уделяется большое внимание. Для увеличения ферментативной активности штаммов-продуцентов дереворазрушающих грибов одним из важных этапов является создание оптимальных условий выращивания, то есть оптимизация факторов культивирования. Данные литературы свидетельствуют, что оптимизацию проводят по различным факторам: температуре, рН, отношению субстрата к влаге, ионам металлов, различным источникам углерода и азота и т.д. [19, 20, 29]. Результаты, полученные различными авторами, имеют много противоречий; это, в основном, касается состава питательной среды для культивирования дереворазрушающих базидиомицетов, в частности, источников органического и неорганического азота [20], некоторых ионов металлов, которые могут ингибировать активность целлюлаз. Для оптимизации продукции дереворазрушающих ферментов применяют различные методы, в том числе полные факторные эксперименты.

Как было показано нами ранее в разделе 2, гриб *F. pinicola* оказался наиболее перспективным продуцентом целлюлаз. Методом математического планирования нами была предпринята попытка оптимизации состава питательной среды для глубинного культивирования другого штамма этого вида *F. pinicola* 5.21, у которого ФБ-активность на 10-е сутки при культивировании на опилках лиственных пород деревьев и на 14-е сутки — при культивировании на опилках хвойных пород деревьев составила соответственно 11 ед/мл и 13,6 ед/мл.

Многофакторный эксперимент 2-го порядка для оптимизации среды культивирования *F. pinicola* в отношении ФБ-активности включал в себя следующие варьируемые параметры: количество опилок (источник углерода), концентрация аммония виннокислого (источник азота), концентрации дигидрофосфата калия ($\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) и кристаллогидрата сульфата магния

($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Определение оптимальных значений было выполнено с помощью метода Бокса — Уилсона. Согласно матрице планирования, эксперимент проводили в двух повторностях с восемью вариантами питательной среды по четырём факторам, ФБ-активность определяли с третьего дня культивирования. Но для расчетов были взяты результаты на седьмые сутки выращивания, когда ФБ-активность была максимальной (табл. 4).

Таблица 4
Ферментативная активность штамма *F. pinicola* 5.21 при глубинном культивировании по методу Бокса — Уилсона (7-е сутки)

№ варианта	ФБ-активность (ед/мл)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1-я серия	3,8190	4,7702	3,9369	4,6036	3,1940	6,9464	5,0250	3,4202
2-я серия	3,7964	5,2381	3,7369	4,6798	3,2262	6,6143	5,1917	3,4845

По результатам двух серий эксперимента были рассчитаны коэффициенты регрессии для каждого фактора (концентраций элементов среды). Было получено уравнение регрессии, описывающее процесс культивирования штамма:

$$P = 4,48 + 0,49 b_1 + 0,16 b_2 - 0,6 b_3 - 0,22 b_4,$$

где b_1 — фактор 1 (опилки), b_2 — фактор 2 (аммоний виннокислый), b_3 — фактор 3 ($\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), b_4 — фактор 4 ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$).

Полученные нами соотношения (уравнения регрессии первого порядка) характеризуются линейным характером взаимосвязи активности фермента с различными концентрациями (факторами) опилок и минеральных солей.

Определение значимости коэффициентов уравнения регрессии проводили с помощью определения дисперсии воспроизводимости процесса (σ^2) и доверительного интервала (ϵ). Для регрессионного уравнения, описывающего эксперимент, получили следующие значения $\sigma^2=0,0255$; $\epsilon=0,008$. При сравнении коэффициентов уравнения регрессии с рассчитанным доверительным интервалом было отмечено, что в уравнении значимыми являются все факторы.

Анализ коэффициентов уравнения регрессии показывает, что на ФБ-активность положительно влияют количество опилок ($b_1=0,49$) и концентрация виннокислого аммония — источника азота ($b_2=0,16$). Отрицательно вли-

яет концентрация K_2HPO_4 ($b_3 = -0,6$) и $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ($b_4 = -0,22$). На параметр оптимизации изученные факторы влияют прямо пропорционально и незначительно, на что указывают линейные эффекты и невысокие значения коэффициентов уравнения регрессии. Все факторы являются значимыми. Это означает, что данные факторы нельзя игнорировать и нельзя увеличивать интервалы варьирования. Полученные нами результаты находятся в соответствии с данными литературы, например, подтверждают отрицательное влияние ионов калия на активность β -глюкозидазы [19].

Заключение

Лигноцеллюлоза древесины — широко доступная возобновляемая биомасса, которую можно преобразовать в биотопливо, имеющее стратегическое значение для альтернативного развития энергетики. Имеются многообещающие прогнозы о том, что ширококомасштабное производство биоэтанола посредством ферментативного гидролиза лигноцеллюлозы в ближайшее время станет экономически выгодным в связи с тем, что этот процесс, будучи экологически безопасным, все более совершенствуется. Предварительная обработка лигноцеллюлозной массы древесины является важным этапом получения сбраживаемых сахаров, на котором происходит увеличение доступности целлюлозы по отношению к целлюлолитическим ферментам за счет разрушения лигнина и гемицеллюлозы, снижения кристалличности целлюлозы и увеличения площади поверхности биомассы. Несмотря на то, что уже разработаны различные методы физической, физико-химической и химической предобработки лигноцеллюлозы, более эффективным и экологичным методом представляется биологическая делигнификация сырья с помощью дереворазрушающих грибов или продуцируемых ими лигнолитическими ферментами (биоалпинг), а также возможность использования дереворазрушающих грибов для получения ферментных препаратов целлюлаз непосредственно для процесса ферментативного гидролиза целлюлозы.

При изучении роста грибов *P. tigrinus* 8/18, *S. hirsutus* ЛЕ-074 и *Pl. ostreatus* на березовых опилках нами было обнаружено, что различные виды грибов в различной степени разрушают отдельные компоненты древесины. Среди трех перечисленных видов наиболее активно лигнин разлагался под действием гриба *S. hirsutus* ЛЕ-074 (заметная деградация лигнина наблюдалась уже на 7-е сутки роста, а на 28-е сутки ферментации гриб усваивал 33,3% лигнина субстрата). Целлюлозный компонент опилок наиболее активно разрушал гриб *P. tigrinus* (на 21-е сутки ферментации потери целлюлозы

достигали 35,5%). Гриб *S. hirsutus* ЛЕ-074 можно рекомендовать для использования в процессе биоалпинга.

По современной номенклатуре, гриб *S. hirsutus* отнесен к роду *Trametes* (*T. hirsuta*). Нами была исследована активность лигнин-разрушающих ферментов двух других штаммов этого вида: *T. hirsuta* 24.24 и 17.24, а также гриба *F. pinicola* 5.21. Было установлено, что *F. pinicola* 5.21 обладает высокой лигнин-пероксидазной активностью, а оба штамма *T. hirsute* 24.24; 17.24 обладают высокой и лигнин-пероксидазной и лакказной активностью. Сочетанное действие ферментов лигнин-пероксидазы с высокой окислительной способностью и низкой специфичностью действия и лакказы, участвующей в ключевых реакциях биодegradации лигнина, делает изученные штаммы гриба *T. hirsuta* перспективными продуцентами окислительных ферментов — деструкторов лигнина.

Нами также выявлено, что оба изученных штамма *F. pinicola* показали высокие активности эндо-1,4- β -глюканазы (19-24 МЕ), β -глюкозидазы (7-8 МЕ), равно как и комплекса ферментов, осаживающих фильтровальную бумагу (0,35 МЕ). По величинам активности ферментов изученные штаммы *F. pinicola* были сравнимы с таковыми у грибов рода *Trichoderma* — активных продуцентов целлюлаз, которые уже нашли свое применение в биотехнологических процессах.

Таким образом, базидиальные дереворазрушающие грибы, для которых ранее была продемонстрирована перспектива использования в биотехнологических процессах получения белково-углеводных кормовых добавок, имеют большой потенциал для получения биотоплива второго поколения из отходов древесного лигноцеллюлозного сырья. От величины вклада целлюлазной и лигнолитической активности в общую дереворазрушающую способность грибов-продуцентов, которая зависит от их видовой принадлежности и штаммовой специфичности, возможно использование дереворазрушающих грибов при биотехнологическом получении биотоплива в различных направлениях: в процессах биоалпинга — прямой биологической делигнификации сырья, либо служить источниками высокоактивных ферментных лигнолитических или целлюлолитических препаратов.

F. pinicola 5.21 с высокой лигнин-пероксидазной активностью и *T. hirsute* 24.24; 17.24 с лакказной и лигнин-пероксидазной активностью способны участвовать в разрушении лигнина в составе древесины.

Авторы посвящают свою статью памяти безвременно ушедшей Эмили Николаевны Ануфриевой, стоявшей у истоков создания нового для лаборатории биохимии и биотехнологии направления в Сыктывкаре

— твердофазной ферментации лигноцеллюлозного вторичного сырья (опилки) дереворазрушающими грибами.

Исследования выполнены по теме НИР Института биологии ФИЦ Коми научного центра УрО РАН № гос. регистрации АААА-А17-117121270025-1 при частичной поддержке НИЦ «Курчатовский институт» в рамках тематического плана.

Литература

1. Ахмедова З.Р. Лигнинолитические ферменты базидиальных грибов. Лигнин-пероксидазы гриба *Pleurotus ostreatus* УзБИ ZAX108.1. Оптимизация ферментообразования и получение препаратов лигниназ // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — Вып. 8. — С. 1375–1385.
2. Бабин А.В., Ракипов Д.Ф. Организация и математическое планирование эксперимента: учеб. пособие для студентов. — Екатеринбург, 2014. — 112 с.
3. Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья (Тр. Коми научного центра УрО Российской академии наук. № 125) / Ред. В.В. Володин. — Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 1992. — 73 с.
4. Вильданов Ф.Ш., Латыпова Ф.Н., Чанышев Р.Р., Николаева С.В. Современные методы получения биоэтанола // Башкирский химический журнал. — 2011. — Т. 18. — № 2. — С. 128–134.
5. Возобновляемая энергия. Производство биотоплива (пер. с англ.) / Под ред. П.Д. Викаш Бабу, П.Д. Ашиш Таплиял, П.Д. Гириеш Кумар Патель. — США, Массачусетс: Scrivener Publishing, 2014. — 250 с.
6. Гаврилова В.Ф., Григорьева Г.К. Рост и образование окислительных ферментов дереворазрушающими грибами из рода *Corticium* // Микология и фитопатология. — 1983. — Т. 17. — Вып. 2. — С. 127–131.
7. Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дутченко Л.Г. и др. Ферментативные системы высших базидиомицетов. — Киев: Наукова думка, 1989. — 280 с.
8. Клесов А.А. Биохимия и энзимология гидролиза целлюлозы // Биохимия. — 1990. — Т. 55. — Вып. 10. — С. 1731–1765.
9. Кожевникова Е.Ю., Петрова Д.А., Новиков А.А., Шнырева А.В., Барков А.В., Винокуров В.А. Перспективы использования новых штаммов базидиальных грибов для прямой конверсии лигноцеллюлозного сырья в биоэтанол // Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — Т. 53. — № 5. — С. 484–489.
10. Королева О.В., Федорова Т.В., Лукина Н.В., Тебенкова Д.Н., Воробьев Р.А. Использование биокаталитических процессов лигноцеллюлозного действия для комплексной переработки отходов целлюлозно-бумажной промышленности. Фундаментальные и прикладные аспекты //

Научное обозрение. Современные проблемы науки и образования. — 2013. — № 5. — Р. 71–71.

11. Маттисон Л.Н., Низковская О.Н. Целлюлозоразрушающая способность базидиальных грибов / В кн.: Ферментативное расщепление целлюлозы. — М.: Наука, 1967. — С. 13–19.
12. Мухин В.А. Биота ксилотрофных базидиомицетов Западно-Сибирской равнины. — Екатеринбург: УИФ «Наука», 1993. — 232 с.
13. Родионова Н.А., Тиунова Н.А., Фениксова Р.В. Методы определения целлюлазной активности // Прикладная биохимия и микробиология. — 1966. — Т. 2. — Вып. 2. — С. 197–205.
14. Тарабукин Д.В. Мультиэнзимные композиции для обработки трудноусвояемых компонентов кормов для птиц и моногастрических животных // Вестник Института биологии. — 2011. — № 10–11. — С. 38–40.
15. Фёдорова Т.В., Шахова Н.В., Кляйн О.И., Глазунова О.А., Малошенко Л.Г., Куликова Н.А., Псурцева Н.В., Королёва О.В. Сравнительный анализ лигнолитического потенциала базидиальных грибов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам // Прикладная биохимия и микробиология. — 2013. — Т. 49. — № 6. — С. 570–579.
16. Archibald F.S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B // Appl. Environ. Microbiol. — 1992. — Vol. 58(9). — P. 3110–3116.
17. Arora D.S., Gill P.K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi // Bioresource Technology. — 2001. — Vol. 77. — P. 89–91.
18. Arora D.S., Sandhu D. Laccase production and wood degradation by a white-rot fungus *Daedalea flavidula* // Enzyme and Microbial Technology. — 1985. — Vol. 7. — No. 8. — P. 405–408.
19. Deswal D., Khasa Y.P., Kuhad R.C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation // Bioresource Technology. — 2011. — Vol. 102. — Iss. 10. — P. 6065–6072.
20. Eliana Estefania Veloz Villavicencio. Enzyme activity profiles of four different decay-strategy fungi cultivated on birch wood and barley straw. Master's thesis. — University of Helsinki, 2019. — 37 p.
21. Farinas Cr.S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector // Renewable and Sustainable Energy Reviews. Elsevier. — 2015. — Vol. 52(C). — P. 179–188.
22. Liu G., Qu Y. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects // Biotechnology Advances. — 2019. — Vol. 37. — P. 519–529.
23. Muktham R., Bhargava S.K., Bankupalli S., Andrew S., Ball A.S. A review on 1st and 2nd generation bioethanol production-recent progress // Journal of Sustainable Bioenergy Systems. — 2016. — Vol. 6. — P. 72–92.
24. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: From Cellulose to Cellulase: Strategies

- to Improve Biofuel Production / Eds. Neha Srivastava, Manish Srivastava, P.K. Mishra, P.W. Ramteke, Ram Lakhan Singh. — Elsevier, 2019. — 314 p.
25. Orth A.B., Royse D.J., Tien M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1993. — Vol. 59. — No. 12. — P. 4017–4023.
 26. Singh A., Bajar S., Devi A., Pant D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications // *Bioresource Technology Reports*. — 2021. — Vol. 14. — Art. 100652.
 27. Taneda D., Ueno Y., Ikeo M., Okino S. Characteristics of enzyme hydrolysis of cellulose under static condition // *Bioresource Technology*. — 2012. — Vol. 121. — P. 154–160.
 28. Yang B., Dai Z., Ding S.-Y., Wyman C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass // *Biofuels*. — 2011. — Vol. 2. — No. 4. — P. 421–450.
 29. Yoon L.W., Ang T.N., Ngoh G.C., and Chua A.S.M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production // *Biomass and Bioenergy*. — 2014. — Vol. 67. — P. 319–338.
 9. Kozhevnikova YeYu Petrova DA, Novikov AA, Shnyreva AV, Barkov AV, Vinokurov VA. Perspektivy ispol'zovaniya novykh shtammov bazidial'nykh gribov dlya pryamoy konversii lignotsellyuloznogo syr'ya v bioetanol. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2017; 53(5):484–489 (in Russian).
 10. Koroleva OV, Fedorova TV, Lukina NV, Teben'kova DN, Vorob'yev RA. Ispol'zovaniye biokataliticheskikh protsessov lignotsellyuloznogo deystviya dlya kompleksnoy pererabotki otkhodov tsellyulozno-bumazhnoy promyshlennosti. *Fundamental'nyye i prikladnyye aspekty. Nauchnoye obozreniye. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* 2013; 5:71–71 (in Russian).
 11. Mattison LN, Nizkovskaya ON. Tsellyulozorazrushayushchaya sposobnost' bazidial'nykh gribov. V kn: *Fermentativnoye rasshchepleniye tsellyulozy*. Moscow: Nauka, 1967: 13–19 (in Russian).
 12. Mukhin VA. Biota ksilotrofnykh bazidiomitsetov Zapadno-Sibirskoy ravniny. *Yekaterinburg: UIF «Nauka»*, 1993: 232 (in Russian).
 13. Rodionova NA, Tiunova NA, Feniksova RV. Metody opredeleniya tsellyulaznoy aktivnosti. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 1966; 2(2):197–205 (in Russian).
 14. Tarabukin DV. Mul'tienzimnyye kompozitsii dlya obrabotki trudnousvoyayemykh komponentov kormov dlya ptits i monogastrichnykh zhivotnykh. *Vestnik Instituta biologii* 2011; 10–11:38–40 (in Russian).
 15. Fodorova TV, Shakhova NV, Klyayn OI, Glazunova OA, Maloshenok LG, Kulikova NA, Psurtseva NV, Korolova OV. Sravnitel'nyy analiz lignoliticheskogo potentsiala bazidial'nykh gribov, prinadlezhashchikh k razlichnym taksonomicheskim i ekologicheskim gruppam. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2013; 49(6):570–579 (in Russian).
 16. Archibald FS. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(9):3110–3116.
 17. Arora DS, Gill PK. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology* 2001; 77:89–91.
 18. Arora DS, Sandhu D. Laccase production and wood degradation by a white-rot fungus *Daedalea flavida*. *Enzyme and Microbial Technology* 1985; 7(8):405–408.
 19. Deswal D, Khasa YP, Kuhad RC. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology* 2011; 102(10):6065–6072.
 20. Eliana Estefania Veloz Villavicencio. Enzyme activity profiles of four different decay-strategy fungi cultivated on birch wood and barley straw. Master's thesis. University of Helsinki, 2019: 37.
 21. Farinas CrS. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier 2015; 52(C):179–188.
 22. Liu G, Qu Y. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects. *Biotechnology Advances* 2019; 37:519–529.

References

1. Akhmedova ZR. Ligninoliticheskiye fermenty bazidial'nykh gribov. *Lignin-peroksidazy griba *Pleurotus ostreatus* UzBI ZAX108.1. Optimizatsiya fermentoobrazovaniya i polucheniye preparatov ligninaz*. *Biokhimiya* 1996; 61(8):1375–1385 (in Russian).
2. Babin AV, Rakipov DF. Organizatsiya i matematicheskoye planirovaniye eksperimenta: ucheb. posobiye dlya studentov. *Yekaterinburg*, 2014: 112 (in Russian).
3. Biokonversiya tsellyulozosoderzhashchego syr'ya (Tr Komi nauchnogo tsentra UrO Rossiyskoy akademii nauk. № 125). *Red VV Volodin. Syktyvkar: Komi NTS UrO RAN*, 1992: 73 (in Russian).
4. Vil'danov FSh, Latypova FN, Chanyshv RR, Nikolayeva SV. Sovremennyye metody polucheniya bioetanol. *Bashkirskiy khimicheskii zhurnal* 2011; 18(2):128–134 (in Russian).
5. Vozobnovlyayemaya energiya. *Proizvodstvo biotopliva (per s angl)*. Pod red PD Vikash Babu, PD Ashish Tapliyal, PD Giriyesh Kumar Patel'. *SSHA, Massachusetts: Scrivener Publishing*, 2014: 250 (in Russian).
6. Gavrilova VF, Grigor'yeva GK. Rost i obrazovaniye oksitel'nykh fermentov derevorazrushayushchimi gribami iz roda *Coriolus*. *Mikologiya i fitopatologiya* 1983; 17(2):127–131 (in Russian).
7. Danilyak NI, Semichayevskiy VD, Dutchenko LG i dr. *Fermentativnyye sistemy vysshikh bazidiomitsetov*. *Kiyev: Naukova dumka*, 1989: 280 (in Russian).
8. Klesov AA. *Biokhimiya i enzimologiya gidroliza tsellyulozy*. *Biokhimiya* 1990; 55(10):1731–1765 (in Russian).

23. Muktham R, Bhargava SK, Bankupalli S, Andrew S, Ball AS. A review on 1st and 2nd generation bioethanol production-recent progress. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems* 2016; 6:72–92.
24. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: From Cellulose to Cellulase: Strategies to Improve Biofuel Production. Eds Neha Srivastava, Manish Srivastava, PK Mishra, PW Ramteke, Ram Lakhan Singh. Elsevier, 2019: 314.
25. Orth AB, Royse DJ, Tien M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 59(12):4017–4023.
26. Singh A, Bajar S, Devi A, Pant D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports* 2021; 14: 100652.
27. Taneda D, Ueno Y, Ikeo M, Okino S. Characteristics of enzyme hydrolysis of cellulose under static condition. *Bioresource Technology* 2012; 121:154–160.
28. Yang B, Dai Z, Ding S-Y, Wyman CE. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* 2011; 2(4):421–450.
29. Yoon LW, Ang TN, Ngoh GC, and Chua ASM. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy* 2014; 67:319–338.

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF WOOD-DESTROYING FUNGI FOR BIOFUEL PRODUCTION

V.V. VOLODIN¹, N.N. SHERGINA^{1,2}, V.V. MARTYNOV¹, S.O. VOLODINA¹, A.A. SHUBAKOV¹,
E.Yu. KOZHEVNIKOVA³, T.I. SHIRSHOVA¹, R.G. VASILOV⁴

¹ *Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch RAS,*

² *Pitirim Sorokin Syktyvkar State University, Syktyvkar;*

³ *Gubkin Russian State University of Oil and Gas (National Research University),*

⁴ *National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow*

Based on the growth characteristics of wood-destroying fungi, their selective action on individual components of lignocellulose and a comparative study of the activity of cellulolytic and lignolytic enzymes, a biotechnological assessment of their use as biological agents in the processes of preliminary delignification of wood raw materials and saccharification of cellulose at the key stage of enzymatic hydrolysis in the production of bioethanol is given. It was revealed that the mushroom *Coriolus hirsutus* LE-074 (syn. *Trametes hirsuta*) possesses the greatest ability to degrade lignin, which by the 28th day of fermentation assimilated 33.3% of lignin when cultivated on birch sawdust. Two strains *Trametes hirsuta* 24.24 and 17.24 have the highest activity of the oxidative enzymes lignin peroxidase and laccase when cultivated on spruce sawdust. The strains of the fungus *Fomitopsis pinicola*, which are comparable in their ability to saccharify cellulose to industrial strains of the fungus of the genus *Trichoderma*, have the highest cellulolytic activity and balance of the composition of cellulases in relation to the enzymatic hydrolysis of cellulose.

Keywords: wood-destroying fungi, lignocellulose, wood, cellulases, ligninases, enzymatic hydrolysis, bioethanol, biofuel.

Address:

Volodin V.V., Ph.D.

Head of the Laboratory, Institute of Biology, Komi Scientific Center,

Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

E-mail: volodin@ib.ksc.komi.ru

Для цитирования:

Володин В.В., Шергина Н.Н., Мартынов В.В., Володина С.О., Шубаков А.А., Кожевникова Е.Ю., Ширшова Т.И., Василов Р.Г. Биотехнологический потенциал дереворазрушающих грибов для получения биотоплива. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(4):11–23.

For citation:

Volodin V.V., Shergina N.N., Martynov V.V., Volodina S.O., Shubakov A.A., Kozhevnikova E.Yu., Shirshova T.I., Vasilov R.G.. Biotechnological potential of wood-destroying fungi for biofuel production. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(4):11–23 (in Russian).

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В ОЧИСТКЕ СТОЧНЫХ ВОД, СОДЕРЖАЩИХ ОТХОДЫ ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА И КОММУНАЛЬНЫЕ СТОКИ

А.В. ГОГОНИН^{1*}, Т.Н. ЩЕМЕЛИНИНА¹, И.В. НОВАКОВСКАЯ¹, Е.Н. ПАТОВА¹,
Е.М. АНЧУГОВА¹, В.А. ЛУКЬЯНОВ², Т.Н. ГАЕВА³, В.В. ВОЛОДИН¹

¹ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар;

² ООО «АЛЬГОТЕК»;

³ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва.

Проведена оценка монокультур микроводорослей *Eustigmatos magnus*, *Coelastrum proboscideum*, *Acutodesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* f. *globosa* и *Anabaena sphaerica* как биотехнологических агентов в процессах очистки сточных вод лесопромышленного комплекса, смешанных с городскими канализационными стоками. Показано, что штамм *Eustigmatos magnus* и штамм *Coelastrum proboscideum*, выделенные из сточной воды аэротенков, эффективно снижают содержание в сточной воде общего фосфора и азота, железа, алюминия, фенолов.

Ключевые слова: экологическая биотехнология, очистка сточных вод, микроводоросли, лесопромышленный комплекс, загрязнение.

Введение

Основными источниками загрязнения и засорения водоемов являются недостаточно очищенные сточные воды промышленных и коммунальных предприятий, крупных животноводческих комплексов. Производственные сточные воды загрязнены в основном отходами и выбросами производства — соединениями азота, фосфора, железа, алюминия и фенола. Загрязняющие вещества, попадая в природные водоемы, приводят к изменению физических свойств и химического состава воды.

В настоящее время существует множество различных методов очистки сточных вод: механические, физико-химические, химические и биологические.

Биологическая очистка сточных вод в аэротенках осуществляется при помощи биоценоза организмов (активного ила), основу которого формируют бактерии, черви, простейшие и водоросли. Биохимическое и физико-химическое взаимодействие между активным илом и сточными водами позволяет извлекать из воды

загрязняющие компоненты. При длительной ассимиляции загрязнителей в активном иле происходит их трансформация до углекислого газа, воды, молекулярного азота и ортофосфатов [4]. На процесс биологической очистки сточных вод оказывают влияние различные факторы: температура в аэротенках, концентрация в воде растворенного кислорода, органических загрязнений и биогенных элементов, а также возраст активного ила. Для обеспечения нормального течения биологических процессов в аэротенках поддерживают определенные режимы, вносят недостающие питательные вещества, проводят регенерацию активного ила. При нарушении конструктивного и энергетического обменов в активном иле рациональным является обновление его состава, путем введения дополнительных биологических агентов, легко культивируемых, имеющих высокую скорость размножения, устойчивых к воздействию загрязняющих веществ и способных к их биотрансформации. Перспективно использование в составе активного ила микроводорослей (МВ). Повышенный интерес к технологии очистки сточных вод с помощью МВ объясняется быстрым ростом культур МВ на сточных водах и отсутствием опасности вторичного загрязнения. МВ участвуют в процессах фитотрансформации загрязнений благодаря способности переводить химические соединения в менее подвижные и активные формы, разрушать органическую часть загрязнений и стимулировать развитие микроорганизмов, принимающих участие в процессе очистки вод.

© 2021 г. Гогонин А.В., Щемелинина Т.Н., Новаковская И.В., Патова Е.Н., Анчугова Е.М., Лукьянов В.А., Гаева Т.Н., Володин В.В.

* Автор для переписки:

Гогонин А.В.

аспирант Института биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук

E-mail: algogonin@gmail.com

Цель работы — оценить эффективность очистки сточных вод с применением монокультур микроводорослей.

Материалы и методы

Сточные воды были отобраны из аэротенков станции биологической очистки лесопромышленного комплекса. Они образуются вследствие смешения двух потоков. Первый поток — это отходы целлюлозно-бумажного производства. В этих стоках загрязняющие вещества представлены фенолами, общим фосфором и азотом, металлами, ионами нитратов, нитритов и аммония. Второй поток — это городские канализационные стоки, в которых содержатся в высоких концентрациях вещества азотной группы, общий фосфор, а также ионы железа.

В качестве объектов исследования были выбраны культуры МВ из коллекции СΥΚΟΑ Института биологии Коми НЦ УрО РАН: *Eustigmatos magnus* (В.-Peters.) Hibberd, *Coelastrum proboscideum* Bohlin,

Acutodesmus obliquus (Turpin) Hegewald & Hanagata (*Tetradismus obliquus* (Turpin) M.J. Wynne), *Chlorella vulgaris* Beijerinck f. *globosa* V. Andreeva (Collection of microalgae strains in the Institute of biology of Komi scientific centre (sykoa), 2019) [5] и *Anabaena sphaerica* Bornet & Flahault, предоставленная ООО «АЛЬГОТЕК».

Эксперименты проводили с использованием питательной среды Люка. Среда Люка — полусинтетическая модифицированная органоминеральная среда, состоящая из глауконита «Ionsorb™» и куриного помета, стабилизированного гашеной известью [6], что исключает применение дорогих реактивов в приготовлении питательных сред.

Накопление биомассы МВ проводили в лабораторных условиях в 250 см³ сосудах на питательной среде Люка в течение 14 дней. Титр клеток культур МВ составил от 2,2 до 2,6×10⁸ кл/см³.

Сточную воду отбирали в день эксперимента из аэротенков станции биологической очистки. Содержание общего азота и фосфора, алюминия, железа и фенола в сточной воде представлено в таблице 1.

Таблица 1

Химический состав сточных вод, использованных для эксперимента

	рН		Al, мкг/дм ³		Fe, мг/дм ³		N _{общ} , мг/дм ³		P _{общ} , мг/дм ³		Фенол, мкг/дм ³	
	рН	S	ρ	S	ρ	S	ρ	S	ρ	S	ρ	S
Поллютанты	7,12	0,14	1,23	0,12	0,83	0,1	2,7	0,5	0,74	0,06	37	2,2

Примечание: ρ — массовая концентрация; S — стандартное отклонение

Подготовленными культурами МВ инокулировали сточную воду, отобранную в день эксперимента, объемом 1% от общего количества исследуемой воды в 1,5 дм³ для каждого штамма в трех повторностях. В течение суток проводили барботаж инокулированной жидкости воздухом с помощью компрессора при комнатной температуре, в режиме освещения фитолампой Osram L 18/77 Флуога, световой поток которой равен 550 lumen. Контролем служила сточная вода, отобранная из аэротенков без внесения инокулята. Эксперимент проводили в течение суток, взяв за основу технологический регламент, используемый для станций биологической очистки сточных вод [12].

Микроскопирование образцов проводили под микроскопом Nikon Eclipse 80i при увеличении до ×1000, оборудованного системой дифференциального интерференционного контраста и видеофиксации изображений. Микрофотографии выполнены с помощью камер Nikon Digital Sight Ds — 2Mv (Nikon, Japan).

Количественный химический анализ образцов сточной воды выполнен в экоаналитической лаборатории

Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Общий азот (N_{общ}) определяли термодаталитическим окислением с хемиллюминесцентным детектированием с помощью анализатора ТОС (Shimadzu). Содержание железа (Fe), алюминия (Al), фосфора общего (P_{общ}) проанализировано методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. Количество фенолов анализировали методом капиллярной газовой хроматографии.

Статистическую обработку данных осуществляли с применением пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2013. При статистической обработке данных использовали *t*-критерий и расчет доверительных интервалов средних арифметических значений.

Результаты и обсуждение

Для оценки влияния МВ на изменение состава основных загрязняющих веществ в сточных водах использованы широко применяемые в альгоиндикационных

и биотехнологических исследованиях виды. Большинство из них имеют широкие ареалы распространения и устойчивы к органическому загрязнению среды [18].

Eustigmatos magnus (SYKOA E-001-09) — водоросль из отдела *Ohrophyta* (Рис. 1). Клетки одиночные коккоидные от 14 до 34 мкм в диаметре. Вид встречается в водной и почвенной среде.

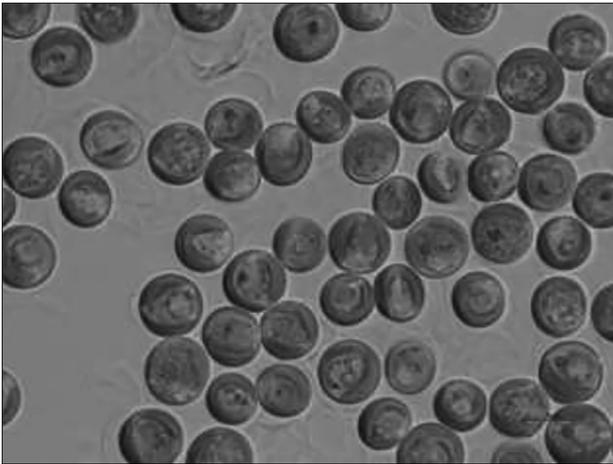


Рис. 1. *Eustigmatos magnus*

Водоросль легко культивируется, толерантна к воздействию тяжелых металлов и устойчива к высоким температурам. Верхний предел устойчивости этой водоросли зафиксирован при температуре воды около 66 °С [7].

Chlorella vulgaris f. *globosa* (SYKOA Ch-011-10) — одноклеточная водоросль из отдела *Chlorophyta* (Рис. 2). Клетки сферической формы от 3,3 до 13,3 мкм в диаметре. Вид характеризуется широким ареалом распространения в водной и наземной среде.

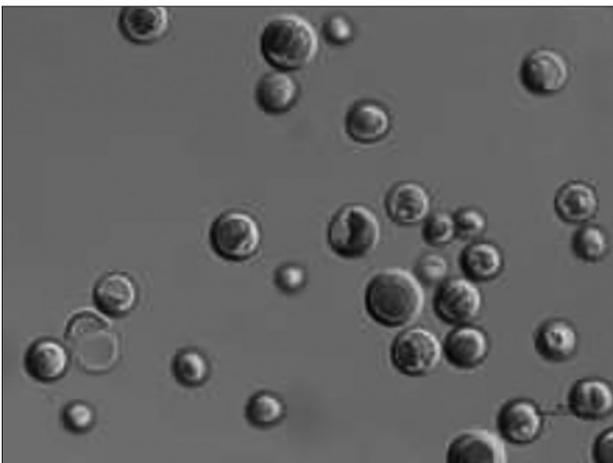


Рис. 2. *Chlorella vulgaris*

Хлорелла чаще всего используется в альголизации водорослевых прудов, биоплат и проточных водоемов для доочистки сточных вод [3]. Относится к альфа-

мезосапробионтным видам, способным выдерживать значительную степень органического загрязнения [1].

Coelastrum proboscideum (SYKOA Ch-033-14) относится к отделу *Chlorophyta* (Рис. 3). Образует ценобии из 4–64 клеток, но встречаются одно- и двухклеточные формы. Клетки от 5 до 30 мкм в диаметре [9]. Вид широко распространен в пресных водоемах с различным уровнем загрязнения поллютантами. Штамм выделен из аэротенков станции биологической очистки лесопромышленного комплекса, где выполнен отбор сточных вод для исследований.

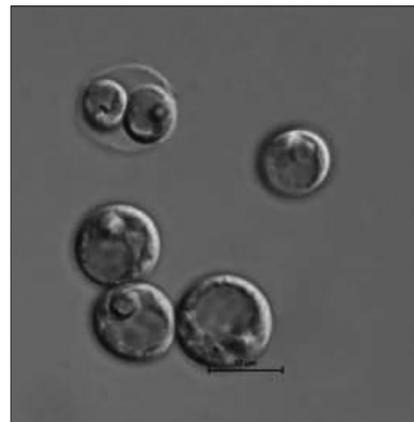


Рис. 3. *Coelastrum proboscideum*

Acutodesmus obliquus (SYKOA Ch-055-12) также относится к отделу *Chlorophyta* (Рис. 4). Образует ценобии из 2–4 клеток, в культуре чаще встречается в виде одиночных клеток 6–15 мкм длиной и 3–11 мкм шириной [9]. Данный штамм также выделен из аэротенков станции биологической очистки лесопромышленного комплекса [10]. Обладает устойчивостью к высоким концентрациям поллютантов, достаточно хорошо переносит условия низкой освещенности. Бета-полисапробионт обитает в высокоэвтрофных водоемах [1].

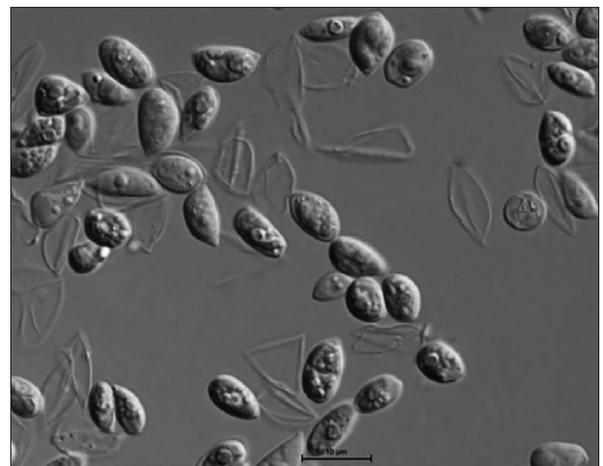


Рис. 4. *Acutodesmus obliquus*

Anabaena sphaerica (IPRAS B-404) — представитель отдела *Cyanoprokaryota* (Рис. 5). Встречается в виде одиночных нитей или плечатых дерновинок. Клетки удлинено-бочковидные, от 3 до 6 мкм шириной и 3–7 мкм длиной [19]. Этот вид фиксирует молекулярный азот [16]. Олигобетамезосапробионт обитает в эвтрофных водоемах [1].

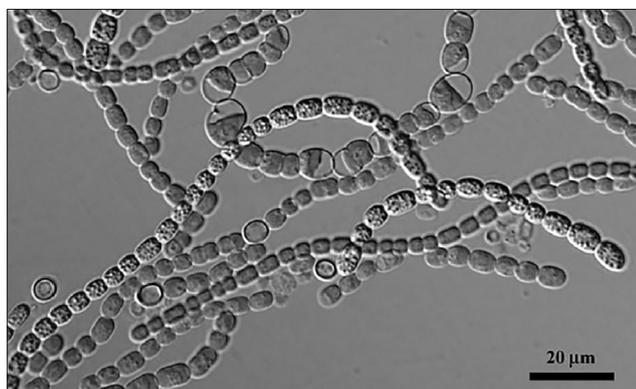


Рис. 5. *Anabaena sphaerica*

Проведенные эксперименты показали изменение содержания загрязняющих веществ в сточных водах в присутствии МВ по сравнению с контролем. Заметное снижение концентрации отмечено для биогенных элементов — азота и фосфора.

Общий азот характеризует валовое содержание всех форм азота в пробе воды, именно он используется для характеристики антропогенной нагрузки природной среды или очистных сооружений [13]. При внесении в сточные воды водорослей отмечено биоразложение соединений азота для всех исследованных монокультур (рис. 6).

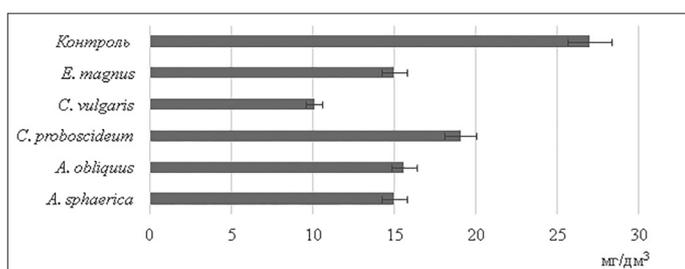


Рис. 6. Содержание общего азота (мг/дм³) в сточных водах

Известно, что этот элемент необходим водорослям для синтеза простых и сложных белков, нуклеиновых кислот, фотосинтетических пигментов и других органических веществ. Недостаток или избыток в среде азота влияет на рост и развитие водорослей, что проявляется в изменении скорости деления клеток, нарушениях функционирования фотосинтетического аппарата, перестройке клеточного метаболизма и обмена веществ [8]. Достоверно значимое

(см. табл. 3) снижение общего азота в экспериментальных условиях наблюдали для *C. vulgaris*, *A. sphaerica*, *E. magnus*, *A. obliquus*, меньшую эффективность проявила микроводоросль *C. proboscideum* (см. рис. 6).

Полученные нами результаты по снижению общего азота МВ от 30 до 63% (за одни сутки эксперимента) согласуются с данными других авторов. Например, для *C. vulgaris* установлено снижение общего азота на 67% за 13 дней [24], для *A. obliquus* до 65% [11]. Для *E. magnus*, *C. proboscideum* и *A. sphaerica* сведения не найдены, так как эти виды мало изучены как биотехнологические агенты в процессах очистки сточных вод.

Общий фосфор — один из основных загрязнителей стоков промышленных предприятий и коммунального хозяйства, его поступление в природные экосистемы приводит к изменению трофического статуса и перестройке сообществ водоемов. Для всех исследованных штаммов при внесении в сточные воды монокультур водорослей наблюдали снижение содержания соединений фосфора (рис. 7). Этот элемент участвует в азотном и углеводном обменах водорослей, в энергетических и биохимических реакциях, а также входит в состав конституционных соединений протоплазмы и ядра. МВ ассимилируют фосфор в ходе синтеза фосфолипидов, а при избыточном поглощении аккумулируют его в виде неорганических полифосфатных гранул [21].

В сточных водах с инокулятами водорослей регистрировали уменьшение содержания $P_{общ}$ в 1,8–7 раз с высоким уровнем статистической значимости ($p > 0,99$) для всех исследованных штаммов. Внесение монокультур *E. magnus*, *A. sphaerica* и *C. proboscideum* привело к наиболее эффективному снижению соединений фосфора в сточной воде.

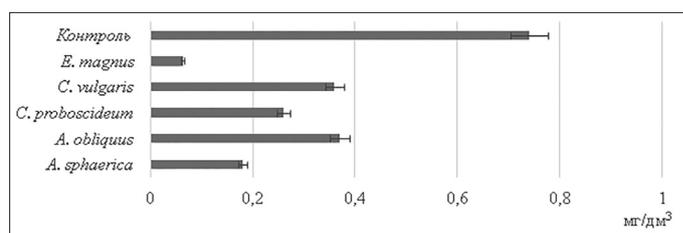


Рис. 7. Содержание общего фосфора (мг/дм³) в сточных водах

Анализ литературных источников выявил, что микроводоросли активно применяют для очистки сточных вод от соединений фосфора. Так, использование *C. vulgaris* в экспериментах [24] снижало содержание $P_{общ}$ до 50% в течение 9 дней, культура *C. microsporium* за 12 суток снижала содержание этого элемента в сточных водах на 43–89% [23].

Железо является биологически активным элементом и оказывает влияние на интенсивность развития фитоплан-

ктон и микрофлоры в водоемах. Этот элемент участвует во многих физиологических процессах в клетках МВ: окислительно-восстановительные реакции фотосинтеза, процессы дыхания и углеводный обмен. Высокие концентрации железа в сточных водах проявляют токсичность для всех живых организмов, включая водоросли. Они могут выступать в качестве катализаторов при формировании гидроксильных радикалов, повреждающих липиды, белки и ДНК. Известно, что водоросли *E. magnus* и *A. sphaerica* обладают высокой способностью к биосорбции тяжелых металлов [14]. В нашем случае найдено достоверное (см. табл. 3) уменьшение содержания ионов Fe^{+2} при внесении культур *E. magnus* и *A. sphaerica*, менее активно сорбировал этот элемент в среде инокулят *C. proboscideum* (рис. 8).

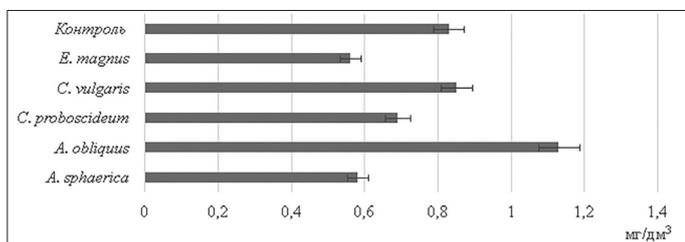


Рис. 8. Содержание ионов железа (мг/дм³) в сточных водах

В образцах с культурами *C. vulgaris* и *A. obliquus* было обнаружено повышенное содержание железа (см. рис. 8), что, вероятно, может быть связано с использованием водопроводной воды, насыщенной ионами железа, в питательной среде Люка, на которой культивировали маточные культуры *C. vulgaris* и *A. obliquus*. Возможно, что накопленные в процессе культивирования ионы железа десорбировались с клеток микроводорослей в сточную воду. Предполагаем, что для включения железа в клеточный метаболизм всех исследуемых штаммов МВ следует увеличить время экспозиции.

Ионы алюминия при поступлении в природные водоемы со сточными водами в высоких концентрациях оказывают токсичное воздействие на водные организмы. При этом в малых дозах алюминий может оказывать стимулирующий эффект на рост культур МВ. В растительной клетке этот элемент контролирует коллоидные свойства и активирует некоторые дегидрогеназы и оксидазы. Чаще всего для биосорбции Al^{3+} используют биомассу бурых водорослей, а также бактериальные культуры в иммобилизованной и свободной формах [17].

Все инокулированные МВ снижали содержание ионов алюминия в сточной воде по отношению к контролю (рис. 9). Содержание Al^{3+} достоверно снижалось ($p > 0,95$) по отношению к контролю при инокуляции сточной воды *E. magnus*, *C. proboscideum* и *A. sphaerica*.

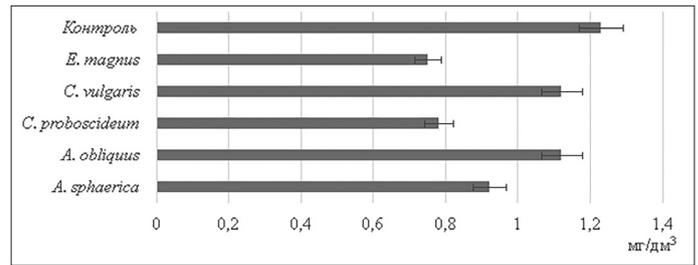


Рис. 9. Содержание ионов алюминия (мг/дм³) в сточных водах

Фенольные соединения в сточной воде лесопромышленного комплекса представляют собой продукты глубокой биодеструкции лигнина. Высокие концентрации фенолов оказывают острое токсическое действие на водоросли, но при этом некоторые цианопрокариоты и эукариотические водоросли способны поглощать и метаболизировать фенольные соединения в процессе жизнедеятельности [20]. Эффект биотрансформации фенолов с высокой достоверностью различия (см. табл. 3) был отмечен у культур МВ *E. magnus*, *C. proboscideum* и *A. sphaerica* (рис. 10).

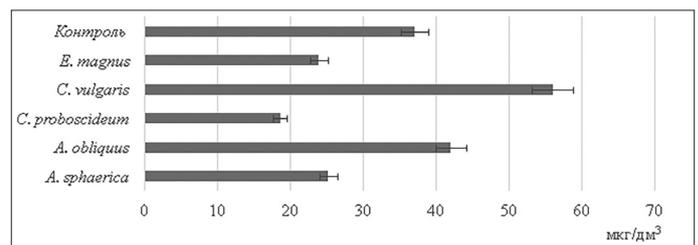


Рис. 10. Содержание фенолов (мкг/дм³) в сточных водах

При инокуляции в сточную воду штаммов *A. sphaerica* и *C. vulgaris* происходило повышение содержания фенолов в исследуемых образцах, что можно обосновать синтезом некоторых фенольных соединений МВ и цианопрокариотами. Например, в составе экстрактов цианопрокариот *Spirulina* sp. и *Nostoc muscorum*, а также у МВ *Chlorella* sp. и *Nannochloropsis oculata* были обнаружены фенольные соединения, которые ингибируют синтез микотоксинов. Рядом ученых было установлено, что МВ *Chlorella* sp. и *Spirulina* sp. могут синтезировать такие фенольные соединения, как: *p*-кумаровая кислота, фороглуцинол, апигенин, галловая кислота, феруловая кислота [15].

Разная абсорбирующая способность использованных штаммов связана с их различными морфологическими, физиологическими и эколого-географическими особенностями. В таблице 2 приведены некоторые характеристики исследованных видов МВ.

Морфологические и экологические особенности видов МВ и их биотехнологические характеристики

Характеристика МВ	<i>Eustigmatos magnus</i>	<i>Anabaena sphaerica</i>	<i>Coelastrum proboscideum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i> f. <i>globosa</i>	<i>Acutodesmus obliquus</i>
Форма клеток	Сферическая	Короткие бочковидные нити	Сферическая, формируют ценобии	Сферическая	Эллипсоидная, ценобии
Размер клеток	От 14 до 34 мкм	Длина 3–7 мкм, Ширина 3–6 мкм	Длина 6–15, Ширина 3–11 мкм	От 3,3 до 13,3 мкм	4–25 мкм длина и 2,2–11 мкм ширина
Состав клеточной оболочки	Пектиновая оболочка	Пептидогликан, пектин и гемицеллюлоза, гликопротеин, полисахариды	Целлюлозно-пектиновая оболочка	Целлюлозно-пектиновая оболочка	Целлюлозно-пектиновая оболочка
Вакуоли	Есть	Нет	Есть	Есть	Есть
Запасные вещества	Хризаламинарин и масло	Гликогенподобный полисахарид, цианофицин и волютин	Крахмал, масло	Крахмал, масло	Крахмал, масло
Уровень трофности	–	Олигобетамезо-сапробионт	Олиго-сапробионт	Альфамезо-сапробионт	Бетаполи-сапробионт
Среды обитания	Водная и почвенная	Водная	Водная	Водная и почвенная	Водная
Биотехнологическая характеристика	Снижает концентрацию: (3+)*N _{общ.} , (5+)P _{общ.} , (4+)Фенолов, (5+)Al ³⁺ (5+)Fe ²⁺	Снижает концентрацию: (2+)N _{общ.} , (4+)P _{общ.} , (3+)Фенолов, (3+)Al ³⁺ (4+)Fe ²⁺	Снижает концентрацию: (1+)N _{общ.} , (3+)P _{общ.} , (5+)Фенолов (4+)Al ³⁺ (3+)Fe ²⁺	Снижает концентрацию: (4+)N _{общ.} , (2+)P _{общ.} , (1+)Al ³⁺	Снижает концентрацию: (3+)N _{общ.} , (1+)P _{общ.} , (2+)Al ³⁺

Примечание: * – эффективность биотрансформации элемента, по шкале от 1+ до 5+

Виды *Coelastrum proboscideum*, *Eustigmatos magnus* и *Acutodesmus obliquus* имеют крупные размеры клеток, а, следовательно, большую поверхность для сорбции загрязняющих веществ из сточной воды. Наличие вакуолей у вышеназванных видов, а также у *Chlorella vulgaris* f. *globosa* обеспечивают хорошую адсорбирующую способность, особенно в старых культурах, которые могут накапливать как запасные вещества, так и конечные продукты метаболизма клетки. Кроме того, пектин, содержащийся в клеточных оболочках, обладает детоксицирующими свойствами, то есть способен сорбировать токсические элементы, радионуклиды и выводить их из организма [2]. Эффективность использования культур МВ в процессах очистки сточных вод может также объясняться их способностью к полноценному развитию в водоемах с различным уровнем трофности. В ходе экспериментов были подтверждены и для ряда исследованных штаммов дополнены экологические характеристики по отношению к трофности воды. Например, *C. vulgaris* относится к альфамезосапробионтам и может обитать в водоемах с высоким уровнем загрязнения, что подтверждается и нашими исследованиями (см. рис. 6, 7, 9).

Вид *E. magnus* приспособлен к обитанию в почвенной и водной средах. Обширный ареал и частая встречаемость свидетельствуют о высокой толерант-

ности данного вида к неблагоприятным условиям среды. Эффективная биодеструкция загрязняющих веществ из сточной воды этим штаммом подтверждается результатами эксперимента (см. рис. 6–10). *A. sphaerica* является олигобетамезосапробионтом (группа организмов, развивающихся в достаточно чистых водоемах), но в нашем случае высокие концентрации загрязняющих веществ в сточной воде не влияют негативно на развитие культуры. Аналогичный вывод можно применить к культуре *C. proboscideum*. Несмотря на обитание этой микроводоросли в олигосапробных зонах (зонах чистой воды), характеризующихся небольшим содержанием органических соединений, инокулированный штамм *C. proboscideum* проявил активность в отношении ряда загрязняющих веществ в органической субстанции (см. рис. 6–10). Несмотря на то, что штамм *A. obliquus* был выделен из исследуемой сточной воды, в ходе проведения эксперимента он проявил невысокую эффективность очистки.

Проведенный анализ позволил найти два наиболее эффективных штамма микроводорослей *E. magnus* и *C. proboscideum* для очистки сточных вод, способных к деструкции и биотрансформации загрязняющих веществ. Для оценки достоверностей различия была составлена таблица 3.

Таблица 3

Показатели достоверностей различия (p) между инокулированными образцами и контролем

Культуры МВ	$N_{\text{общ}}$	$P_{\text{общ}}$	Фенолы	Al^{3+}	Fe^{2+}
<i>E. magnus</i>	0,99	0,995	0,98	0,95	0,90
<i>C. proboscideum</i>	0,95	0,99	0,99	0,95	—
<i>A. sphaerica</i>	0,99	0,99	0,98	0,90	0,90
<i>C. vulgaris</i>	0,995	0,98	—	—	—
<i>A. obliquus</i>	0,98	0,98	—	—	—

Выявлен ряд эффективности МВ в отношении снижения загрязняющих веществ в пределах доверительной вероятности различий между образцами и контролем:

$N_{\text{общ}}$: *C. vulgaris* > *A. sphaerica* > *E. magnus* > *A. obliquus* > *C. proboscideum*.

$P_{\text{общ}}$: *E. magnus* > *A. sphaerica* > *C. proboscideum* > *C. vulgaris* > *A. obliquus*.

Фенолы: *C. proboscideum* > *E. magnus* > *A. sphaerica*.

Al^{3+} : *E. magnus* > *C. proboscideum* > *A. obliquus*.

Fe^{2+} : *E. magnus* > *A. sphaerica*.

Как видно из ряда эффективностей, не все культуры достоверно снижали фенолы, аккумулировали ионы железа и алюминия по отношению к контрольному образцу.

Заключение

На основании проведенной биотехнологической оценки монокультур микроводорослей выявлены два штамма *Eustigmatos magnus* и *Coelastrum proboscideum*, наиболее эффективных в очистке от загрязняющих веществ сточной воды в пределах доверительной вероятности различий между образцами и контролем. Показано, что при введении культур *Eustigmatos magnus* и *Coelastrum proboscideum* в сточную воду, отобранную из аэротенков лесопромышленного комплекса, снижается содержание общего фосфора (33–84%) при $p=0,995-0,99$, общего азота (5–25%) при $p=0,99-0,95$, железа (8–25%) при $p=0,90$, алюминия (8–40%) при $p=0,95$ и фенолов (15–50%) при $p=0,98-0,99$.

Штаммы микроводорослей *Eustigmatos magnus* и *Coelastrum proboscideum* могут быть рекомендованы в качестве биотехнологических стимуляторов очистки сточных вод от основных загрязняющих веществ при их периодическом введении в аэротенки. Кроме того, на основе культур, эффективно очищающих сточные воды, возможно создание консорциума МВ в целях проявления синергетического эффекта.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания № АААА-А17-117121270025-1 «Разработка биокаталитических систем на основе ферментов, микроорганизмов и растительных клеток, их иммобилизованных форм и ассоциаций для переработки растительного сырья, получения биологически активных веществ, биотоплива, ремедиации загрязненных почв и очистки сточных вод».

Авторы выражают благодарность экоаналитической лаборатории Института биологии Коми НЦ УрО РАН за помощь при проведении аналитических работ.

Литература

1. Барина С.С., Медведева Л.А., Анисимова О.В. Биоразнообразие водорослей-индикаторов окружающей среды. — Тель-Авив: Pilies Studio, 2006. — 498 с.
2. Бокова Т.Н. Детоксикация антропогенных загрязнителей в системе растение (корм) — животное // Антропогенная трансформация природной среды: материалы международной конференции. — 2010. — № 1. — С. 153–158.
3. Кирилина Т.В., Ханг Д.Т.Т., Сироткин А.С. Оценка эффективности доочистки сточных вод с использованием одноклеточных и многоклеточных гидробионтов // Вестник Казанского технологического университета. — 2013. — Т. 16. — № 8. — С. 200–203.
4. Козлов М.Н. Микробиологический контроль активного ила биореакторов очистки сточных вод от биогенных элементов. — М.: Наука, 2012. — 80 с.
5. Коллекция микроводорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН, Россия, Сыктывкар, 2010–2018. URL: <https://ib.komisc.ru/sykoa/eng/>, дата обращения 23.03.2019.
6. Михайлюк А.В., Щемелинина Т.Н., Анчугова Е.М. Питательная среда Люка для культивирования микроводорослей. Патент РФ 2556126. Заявка: 2014112676/10, 01.04.2014. — 2015.
7. Сафиуллина Л.М. Толерантность почвенных водорослей *Eustigmatos magnus* (B.Petersen) Hibberd (*Eustigmatophyta*) и *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow in Cleve et Grunow (*Bacillariophyta*) к воздействию тяжелых металлов // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2009. — № 6(100). — С. 609–610.
8. Синетова М.П., Маркелова А.Г., Лось Д.А. Влияние азотного голодания на ультраструктуру и пигментный состав хлоропластов ацидотермофильной микроводоросли *Galdieria sulphuraria* // Физиология растений. — 2006. — Т. 53. — № 2. — С. 172–181.
9. Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. — Киев: Наукова думка, 1990. — 208 с.

10. Шемелинина Т.Н., Анчугова Е.М., Тарабукин Д.В., Володин В.В., Маркарова М.Ю., Патова Е.Н., Новаковская И.В. Штамм зеленой микроводоросли *Acutodesmus obliquus*, предназначенный для очистки сточных вод от загрязняющих веществ в коммунальном хозяйстве и целлюлозно-бумажной промышленности. Патент РФ 2556131. Заявка: 2014112676/10, 01.04.2014.
11. Шемелинина Т.Н., Патова Е.Н., Тарабукин Д.М., Анчугова Е.М., Очеретенко Д.П., Володин В.В. Очистка сточных вод лесопромышленного комплекса с использованием микроводорослей // Экология и промышленность России. — 2015. — Т. 19. — С. 44–47.
12. Щетинин А.И., Костин Ю.В., Андреев Е.Л., Есин М.А., Малбиев Б.Ю., Демяненко Е.В., Юрченко В.А. Сыктывкарский ЛПК: решение проблем очистки сточных вод // Водоснабжение и санитарная техника. — 2010. — № 11. — С. 34–38.
13. Ягов Г.В. Контроль содержания соединений азота при очистке сточных вод // Водоснабжение и санитарная техника. — 2008. — № 7. — С. 45–49.
14. Abdel-Aty A.M., Ammar N.S., Ghafar H.H.A., Ali R.K. Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass // Journal of Advanced Research. — 2013. — Vol. 4. — P. 367–374.
15. Andrade L.M., Andrade C.J., Dias M. Chlorella and Spirulina microalgae as sources of functional foods, nutraceuticals, and food supplements; an overview // MOJ Food Processing & Technology. — 2018. — Vol. 6(1). — P. 45–58.
16. Chakraborty S., Tiwari B., Singh S.S., Srivastava A.K., Mishra A.K. Differential physiological, oxidative and antioxidative responses of cyanobacterium *Anabaena sphaerica* to attenuate malathion pesticide toxicity // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. — 2017. — Vol. 11. — P. 56–63.
17. Dhanarani S., Viswanathan E., Piruthiviraj P., Arivalagan P., Kaliannan T. Comparative study on the biosorption of aluminum by free and immobilized cells of *Bacillus safensis* KTSMBNL 26 isolated from explosive contaminated soil // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. — 2016. — Vol. 69. — P. 1–7.
18. He P.J., Mao B., Shen C.M., Shao L.M., Lee D.J., Chang J.C. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production // Bioresource Technology. — 2013. — Vol. 129. — P. 177–181.
19. Komárek J. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota III: Nostocales, Stigonematales. Bd. 19/3. — Heidelberg: Springer Spektrum, 2013. — 1131 p.
20. Lika K., Papadakis I.A. Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae // Journal of Sea Research. — 2009. — Vol. 62. — P. 135–146.
21. Schmidt J.J., Gagnon G.A., Jamieson R.C. Microalgae growth and phosphorus uptake in wastewater under simulated cold region conditions // Ecological Engineering. — 2016. — Vol. 95. — P. 588–593.
22. Souza M.M., Prieto L., Ribeiro A.C., Souza T.D., Badiale-Furlong E. Assesment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus* // Ciência e Agrotecnologia. — 2011. — Vol. 35. — P. 1050–1058.
23. Vo H.N.Ph., Ngo H.H., Guo W., Nguyen T.M.H., Liu Y., Liu Y. A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment // The Science of The Total Environment. — 2019. — Vol. 651(1). — P. 1549–1568.
24. Wang L., Min M., Li Y., Chen P., Chen Y., Liu Y., Wang Y., Ruan R. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant // Applied Biochemistry and Biotechnology. — 2010. — Vol. 162. — P. 1174–1186.

References

1. Barinova SS, Medvedeva LA, Anisimova OV. Bioraznoobraziye vodorosley-indikatorov okruzhayushchey sredy. Tel'-Aviv: Pilies Studio, 2006: 498 (in Russian).
2. Bokova TN. Detoksikatsiya antropogennykh zagryazniteley v sisteme rasteniy (korm) — zhivotnoye. Antropogennaya transformatsiya prirodnoy sredy: materialy mezhdunarodnoy konferentsii 2010; 1:153–158 (in Russian).
3. Kirilina TV, Khang DTT, Sirotkin AS. Otsenka effektivnosti doochistki stochnykh vod s ispol'zovaniyem odnokletochnykh i mnogokletochnykh gidrobiontov. Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta 2013; 16(8):200–203 (in Russian).
4. Kozlov MN. Mikrobiologicheskij kontrol' aktivnogo ila bioreaktorov ochistki stochnykh vod ot biogennykh elementov. Moscow: Nauka, 2012: 80 (in Russian).
5. Kolleksiya mikrovodorosley Instituta biologii Komi NTS UrO RAN, Rossiya, Syktyvkar, 2010–2018. URL: <https://ib.komisc.ru/sykoa/eng/>, data obrashcheniya 23.03.2019 (in Russian).
6. Mikhaylyuk AV, Shchemelinina TN, Anchugova YeM. Pitatel'naya sreda Lyuka dlya kul'tivirovaniya mikrovodorosley. Patent RF 2556126. Zayavka: 2014112676/10, 01.04.2014. 2015 (in Russian).
7. Safullina LM. Tolerantnost' pochvennykh vodorosley *Eustigmatos magnus* (B.Petersen) Hibberd (*Eustigmatophyta*) i *Hantzschia amphioxys* (Ehrenberg) Grunow in Cleve et Grunow (*Bacillariophyta*) k vozdeystviyu tyazhelykh metallov. Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta 2009; 6(100):609–610 (in Russian).
8. Sinetova MP, Markelova AG, Los' DA. Vliyaniye azotnogo golodaniya na ul'trastrukturu i pigmentnyy sostav khloroplastov atsidotermofil'noy mikrovodorosli *Galdieria sulphuraria*. Fiziologiya rasteniy 2006; 53(2):172–181 (in Russian).
9. Tsarenko PM. Kratkiy opredelitel' khlorokokkovykh vodorosley Ukrainskoy SSR. Kiyev: Naukova dumka, 1990: 208 (in Russian).
10. Shchemelinina TN, Anchugova YeM, Tarabukin DV, Volodin VV, Markarova MYu, Patova YeN, Novakovskaya IV.

- Shtamm zelenoy mikrovodorosli *Acutodesmus obliquus*, prednaznachenny dlya ochistki stochnykh vod ot zagryaznyayushchikh veshchestv v kommunal'nom khozyaystve i tsellyulozno-bumazhnoy promyshlennosti. Patent RF 2556131. Zayavka: 2014112676/10, 01.04.2014 (in Russian).
11. Shchemelinina TN, Patova YeN, Tarabukin DM, Anchugova YeM, Ocheretenko DP, Volodin VV. Ochistka stochnykh vod lesopromyshlennogo kompleksa s ispol'zovaniyem mikrovodorosley. *Ekologiya i promyshlennost' Rossii* 2015; 19:44–47 (in Russian).
 12. Shchetinin AI, Kostin YuV, Andreyev YeL, Yesin MA, Malbiyev BYu, Demyanenko YeV, Yurchenko VA. Syktyvkar'skiy LPK: resheniye problem ochistki stochnykh vod. *Vodosnabzheniye i sanitarnaya tekhnika* 2010; 11:34–38 (in Russian).
 13. Yagov GV. Kontrol' sodержaniya soyedineniy azota pri ochistke stochnykh vod. *Vodosnabzheniye i sanitarnaya tekhnika* 2008; 7:45–49 (in Russian).
 14. Abdel-Aty AM, Ammar NS, Ghafar HHA, Ali RK. Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass. *Journal of Advanced Research* 2013; 4:367–374.
 15. Andrade LM, Andrade CJ, Dias M. Chlorella and Spirulina microalgae as sources of functional foods, nutraceuticals, and food supplements; an overview. *MOJ Food Processing & Technology* 2018; 6(1):45–58.
 16. Chakraborty S, Tiwari B, Singh SS, Srivastava AK, Mishra AK. Differential physiological, oxidative and antioxidative responses of cyanobacterium *Anabaena sphaerica* to attenuate malathion pesticide toxicity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2017; 11:56–63.
 17. Dhanarani S, Viswanathan E, Piruthiviraj P, Arivalagan P, Kaliannan T. Comparative study on the biosorption of aluminum by free and immobilized cells of *Bacillus safensis* KTSMBNL 26 isolated from explosive contaminated soil. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2016; 69:1–7.
 18. He PJ, Mao B, Shen CM, Shao LM, Lee DJ, Chang JC. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. *Bioresource Technology* 2013; 129:177–181.
 19. Komárek J. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota III: Nostocales, Stigonematales. Bd 19/3. Heidelberg: Springer Spektrum, 2013: 1131.
 20. Lika K, Papadakis IA. Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *Journal of Sea Research* 2009; 62:135–146.
 21. Schmidt JJ, Gagnon GA, Jamieson RC. Microalgae growth and phosphorus uptake in wastewater under simulated cold region conditions. *Ecological Engineering* 2016; 95:588–593.
 22. Souza MM, Prieto L, Ribeiro AC, Souza TD, Badiale-Furlong E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciência e Agrotecnologia* 2011; 35:1050–1058.
 23. Vo HNPh, Ngo HH, Guo W, Nguyen TMH, Liu Y, Liu Y. A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment. *The Science of The Total Environment* 2019; 651(1):1549–1568.
 24. Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010; 162:1174–1186.

THE APPLICATION OF MICROALGAE IN THE TREATMENT OF EFFLUENTS CONTAINING BOTH PULP-AND-PAPER WASTE AND MUNICIPAL DRAINAGE

A.V. GOGONIN¹, T.N. SCHEMELININA¹, I.V. NOVAKOVSKAYA¹, E.N. PATOVA¹,
E.M. ANCHUGOVA¹, V.A. LUKYANOV², T.N. GAEVA³, V.V. VOLODIN¹

¹*Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar;*

²*«Algotec» LLC,*

³*National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow*

Monocultures of *Eustigmatos magnus*, *Coelastrum proboscideum*, *Acutodesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* f. *globosa*, and *Anabaena sphaerica* as biotechnological agents in the treatment of a mixture of timber processing waste and municipal effluents were estimated. It was shown that the *Eustigmatos magnus* strain and the *Coelastrum proboscideum* strain isolated from the waste water of aeration tanks effectively reduce the content of total phosphorus and nitrogen, iron, aluminum, phenols in the waste water.

Keywords: ecological biotechnology, wastewater treatment, microalgae, timber enterprise, pollution.

Address:

Gogonin A.V.

Post-graduate student of the Institute of Biology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

E-mail: algogonin@gmail.com

Для цитирования:

Гогонин А.В., Щемелинина Т.Н., Новаковская И.В., Патова Е.Н., Анчугова Е.М., Лукьянов В.А., Гаева Т.Н., Володин В.В. Применение микроводорослей в очистке сточных вод, содержащих отходы целлюлозно-бумажного производства и коммунальные стоки. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(4):24–33.

For citation:

Gogonin A.V., Schemelinina T.N., Novakovskaya I.V., Patova E.N., Anchugova E.M., Lukyanov V.A., Gaeva T.N., Volodin V.V. The application of microalgae in the treatment of effluents containing both pulp-and-paper waste and municipal drainage. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(4):24–33 (in Russian).

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФАГА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ ЭЛЬТОР

К.С. ГУМАЮНОВА¹, О.С. ЗИНИНА¹, М.В. ОВЧИННИКОВА^{1*}, Н.Е. ГАЕВСКАЯ²,
Ю.В. СИНЯГИНА¹, А.К. НИКИФОРОВ¹

¹ ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», Саратов;

² ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Высокая специфичность, экспрессность и доступность фагового метода обуславливают его востребованность в схеме лабораторной диагностики возбудителей опасных инфекционных заболеваний. В настоящее время для определения биовара холерного вибриона применяемый коммерческий препарат «Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей» не всегда отвечает поставленной задаче по идентификации исследуемых микроорганизмов, вследствие высокого уровня адаптации патогена к меняющимся условиям окружающей среды. В связи с этим в целях совершенствования фагового метода в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» был сконструирован экспериментальный диагностический фаговый препарат для идентификации *V. cholerae* O1 биовара эльтор. Целью настоящей работы являлось определение спектра литической активности и специфичности экспериментального фага для установления его диагностической ценности. В работе использовали 95 штаммов из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (Саратов), обладающих типичным культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Установлено, что из 85 штаммов *V. cholerae* O1 классического и эльтор биоваров опытный фаг и препарат сравнения (коммерческий фаг эльтор) лизировали 45,7% и 40% штаммов биовара эльтор соответственно. Отмечалось, что препараты были строго специфичны по отношению к штаммам гетерологичного биовара и культурам *V. cholerae* не O1 не O139 серогрупп. Анализ спектра литической активности показал, что экспериментальный фаг в диагностическом рабочем титре (ДРТ) и препарат сравнения действовали идентично на взятые в опыт штаммы независимо от их генетического профиля, географического положения, времени и места выделения, что указывает на низкую диагностическую ценность нового фага. Однако опытный препарат в цельном виде может быть использован в качестве прототипа активных фаговых модификантов при конструировании новых фаговых препаратов для совершенствования диагностики холерных вибрионов биовара эльтор.

Ключевые слова: холера; бактериофаги; совершенствование диагностики; специфическая активность; специфичность.

Введение

Научные достижения последних десятилетий в генетике, биологии, биотехнологии диктуют необходимость по-новому взглянуть на решение существующих и вновь возникающих проблем в вопросах диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней бактериальной природы.

Совершенствование диагностики всегда актуально во всех областях и направлениях. Это касается как стандартных алгоритмов и схем, так и непосредственно инструментов диагностики [5, 6]. Совершенствование может осуществляться путем конструирования и внедрения новых диа-

гностических систем и препаратов, изменения составных частей продукта, оптимизаций этапов производства и т.д. Движущей же силой процесса совершенствования являются возрастающие требования к диагностическим препаратам, а также изменения свойств диагностических объектов.

Эпидемический потенциал *Vibrio cholerae* O1 биовара эльтор вследствие высокого уровня адаптации к меняющимся условиям окружающей среды ярко выражается в глубоких эволюционных изменениях молекулярно-генетической организации холерного вибриона [7, 9] и обуславливает большой практический интерес в плане индикации и идентификации возбудителя [9].

Существующие диагностические бактериофаги в силу таких особенностей, как экспрессность и высокая специфичность, по-прежнему оставляют за собой право занимать важное место в лабораторной диагностике холерных вибрионов [2, 4]. Однако в настоящее время в связи с широкой бактериальной изменчивостью применяемый в схеме лабораторных исследований на холеру [3] для опреде-

© 2021 г. Гумаюнова К.С., Зинина О.С., Овчинникова М.В., Гаевская Н.Е., Синягина Ю.В., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

Овчинникова Мария Владимировна

к.б.н., зав. лабораторией диагностических препаратов ФКУЗ
РосНИПЧИ «Микроб»

E-mail: begemot2006@list.ru

ления биовара холерного вибриона коммерческий препарат «Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей» не всегда отвечает поставленной задаче по идентификации исследуемых микроорганизмов. Вследствие этого совершенствование фагового метода является актуальной задачей.

Пути совершенствования фагодиагностики могут идти в двух направлениях. Первое направление связано с адаптацией имеющегося фага к фагорезистентным штаммам и искусственному получению его модификантов с активным действием [1]. Второе связано с поиском и выделением из различных объектов новых фагов с широким спектром действия в отношении соответствующих групп микроорганизмов [8, 10]. И первое и второе направления эффективны, хотя достаточно длительны и трудоемки, и не всегда вновь выделенные или адаптированные фаги отвечают таким требованиям лабораторной диагностики, как высокая литическая активность и специфичность, а также задачам производственного процесса: воспроизводимость, техническая простота в изготовлении, приемлемая себестоимость.

Сотрудниками Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора из объектов окружающей среды были выделены новые фаги и из них сконструирован диагностический фаговый препарат для идентификации *V. cholerae* O1 биовара эльтор, характеризующийся высоким уровнем специфической активности. Так как РосНИПЧИ «Микроб» является единственным на территории Российской Федерации производителем диагностических бактериофагов, специфичных в отношении чумы, холеры и псевдотуберкулеза, целью настоящей работы явилось определение спектра литической активности и специфичности усовершенствованного экспериментального фага для установления диагностической ценности и определения целесообразности возможного серийного выпуска представленного препарата.

Материалы и методы

Объект. Исследовали экспериментальный диагностический холерный фаг эльтор жидкий для идентификации холерных вибрионов O1 биовара эльтор, предоставленный ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора». Препарат сравнения — бактериофаг диагностический холерный эльтор из коммерческого препарата «Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей» производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

В эксперименте всего было использовано 95 штаммов, предоставленных Государственной коллекцией патогенных

бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (ГКПБ «Микроб»), обладающих типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами.

Главными критериями выбора штаммов являлись наличие чувствительности (лизируются до ДРТ) или резистентности (не лизируются или лизируются в титрах ниже ДРТ) к коммерческому бактериофагу диагностическому холерному эльтор, чувствительность к коммерческому классическому бактериофагу (данные паспортов штаммов).

Для определения спектра литической активности в опыте использовали 70 штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор, выделенных в периоды с 1970 по 2020 гг. и условно разделенных по этому признаку на две группы: первая — годы выделения с 1970 по 1999 гг., вторая группа — с 2000 по 2020 гг. Специфичность препаратов контролировали на 15 штаммах холерного вибриона классического биовара и 10 штаммах *V. cholerae* не O1 серогруппы.

Местами выделения выбранных штаммов были преимущественно территория Российской Федерации (70 штаммов), а также очаги холеры в Индии, Пакистане, Афганистане, Вьетнаме, Гвинее и Корее (10 штаммов). Источники выделения различны: 47 штаммов были выделены из объектов внешней среды (вода), 23 микроорганизма — от больных людей, 1 штамм — секционный материал, источник выделения не известен у 13 штаммов. Данные о дате, месте и источнике выделения для микроорганизмов *V. cholerae* не O1 не O139 серогрупп отсутствовали.

Ход работы. Ампулы с лиофилизированными культурами микроорганизмов вскрывали и растворяли в 0,5 мл 0,9% стерильного раствора натрия хлорида и засеивали в жидкую питательную среду pH 7,6±0,1, инкубировали при температуре 37±1 °С в течение 3–4 ч. Затем осуществляли высеивание на чашки Петри с плотной питательной средой (агар Хоттингера pH 7,6±0,1), инкубировали при температуре 37±1 °С в течение 18–20 ч. Следующий этап заключался в отборе типичных колоний и пересеве на агаровые пластины pH 7,6±0,1. Для постановки пробы с фагами использовали 3-часовые бульонные культуры.

В предварительных экспериментах была выявлена высокая специфическая активность экспериментального фагового препарата в цельном виде — констатировали лизис 95,7% штаммов холерного вибриона биовара эльтор, но наблюдали полное отсутствие специфичности в отношении штаммов *V. cholerae* O1 классического биовара. Для повышения данного спецификационного показателя были проведены дополнительные исследования по определению диагностического рабочего титра экспериментального фага.

Определение спектра литической активности и специфичности проводили методом агаровых слоев по Грациа. Холерный бактериофаг эльтор (часть из коммерческого препарата), лиофилизат и экспериментальный диагностический холерный фаг эльтор, жидкий применяли в ДРТ — 10^{-2} .

Оценку литической активности фагов проводили по 4-балльной системе. За положительный результат принимали любую степень лизиса:

«4+» — сливной полный лизис культуры с прозрачным дном литического пятна;

«3+» — прозрачное пятно с единичными колониями вторичного роста или множество изолированных литических пятен;

«2+» — прозрачное пятно лизиса со значительным вторичным ростом или единичные изолированные пятна лизиса;

«1+» — слабозаметное пятно лизиса культуры.

Результаты и обсуждение

Степень лизиса фагочувствительных штаммов у опытного фага и препарата сравнения визуально оценивали от прозрачного пятна до прозрачного пятна с колониями вторичного роста. У некоторых культур на месте нанесения экспериментального препарата наблюдали признаки вторичного роста по ходу литического пятна. Но данный факт не отражался на оценке активности опытного образца.

Результаты испытаний экспериментального диагностического холерного фага эльтор для идентификации холерных вибрионов O1 биовара эльтор, сконструированного в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты оценки спектра литической активности и специфичности экспериментального холерного фага эльтор и коммерческого препарата бактериофага холерного эльтор

№ п/п	№ штамма	Место, год, источник выделения	Генетическая характеристика	Экспериментальный фаг эльтор, жидкий ДРТ 10^{-2} («Ростов»)	Бактериофаг диаг. холер. эльтор, сухой, ДРТ 10^{-2} («Микроб»)
1	2	3	4	5	6
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor					
1	М-1523	Татарстан, 2014, вода	ctxA ⁻	3*	3
2	М-1429	Белорецк, 2004, чел-к	ctxA ⁺	3	1
3	М-1530	Челябинск, 2015, о. Курочкино	ctxA ⁻	3	-
4	М-1272	Краснодар, 1993, чел-к	н/д**	4	4
5	М-1286	Дагестан, 1994, чел-к	н/д	3	3
6	М-1341	Казань, 2001, вода	н/д	4	4
7	М-1353	Казань, 2001, вода	н/д	4	4
8	М-1462	Москва, 2010, чел-к	н/д	4	4
9	М-1463	Москва, 2010, чел-к	н/д	2	4
10	М-1485	Таганрог, 2011, вода	н/д	3	3
11	М-1509	Химки, 2012, чел-к	н/д	4	4
12	11	Элиста, 2015, вода	н/д	4	3
13	М-879	Саратов, 1970, чел-к	н/д	4	4
14	М-1425	Пермь, 2003, ст. вода	н/д	3	3
15	М-1460	Татарстан, 2010, р. Казанка	н/д	4	4
16	М-1501	Элиста, 2011, чел-к	н/д	4	4
17	95	Гвинея, 1986, чел-к	ctxA ⁺	3	3
18	317 В	Вьетнам, 1993, чел-к	ctxA ⁺	4	4
19	С-418	Ставрополь, 1990, чел-к	ctxA ⁺	4	4
20	М-588	Пермь, 1974, чел-к	ctxA ⁺	4	4
21	М-609	Саратов, 1975, чел-к	ctxA ⁺	4	4
22	М-910	Самара, 1970, чел-к	ctxA ⁺	4	4
23	М-924	Н.-Новгород, 1971, чел-к	ctxA ⁺	4	4
24	М-1329	Астрахань, 1999, река Прямая Болда.	ctxA ⁻	3	3
25	М-1330	Астрахань, 1999, река Волга	ctxA ⁻	3	3
26	М-1420	Пермь, 2002, река Ласьва.	ctxA ⁻	3	3
27	М-1571	Р. Татарстан, с. Чипчуги 2020, река Казанка	ctxA ⁻	2	2
28	М-1558	Калмыкия, 2019, вода	н/д	4	4
29	М-1566	Р. Удмуртия, с. Гальяны, 2020, река Кама	н/д	1	-
30	М-1570	Р. Удмуртия, с. Гальяны, 2020, река Кама	н/д	2	2
31	М-1320	Саратов, 1998, вода	н/д	1	-
32	М-1562	Элиста, 2019, пруд Заячий.	н/д	1	-
33	М-1262	Ижевск, 1990, река Чепца	ctxA ⁻	-	-

34	М-1265	Башкирия, 1994, р. Дема	ctxA ⁻	-	-
35	М-1390	Астрахань, 2002, р. Волга	ctxA ⁻	-	-
36	М-1391	Астрахань, 2002, р. Царев	ctxA ⁻	-	-
37	М-1392	Астрахань, 2002, р. Царев	ctxA ⁻	-	-
38	М-1510	Казань, 2012, р. Волга	ctxA ⁻	+/-	-
39	М-1515	Элиста, 2012, река Элистинка	ctxA ⁻	-	-
40	М-1517	Элиста, 2012, п. Колонский	ctxA ⁻	-	-
41	М-1418	Пермь, 2002, р. Ласьва	ctxA ⁻	-	-
42	8	Элиста, 2014, пруд Колонский	ctxA ⁻	-	-
43	57	Элиста, 2014, пруд Заячий	ctxA ⁻	-	-
44	М-1267	Пермь, 1994, река Кама	ctxA ⁺	-	-
45	М-1269	Магнитогорск, 1994, чел-к	ctxA ⁺	-	-
46	М-1271	Набережные Челны, 1993, большой	ctxA ⁺	-	-
47	М-1335	Астрахань, 2000, вода	ctxA ⁻	-	-
48	М-1338	Астрахань, 2000, чел-к	ctxA ⁻	-	-
49	М-1343	Казань, 2001, вода	н/д	+/-	+/-
50	Р-18775	Каменка, 2005, чел-к	н/д	-	-
51	М-1506	Элиста, 2011, вода	н/д	-	-
52	М-1529	Р. Татарстан, 2016, река Ик	ctxA ⁻	-	-
53	М-1572	Р. Татарстан, с. Нармонка, 2020, река Бурейка.	ctxA ⁻	-	-
54	М-1115	Саранск, 1977, чел-к	ctxA ⁻	-	-
55	М-1118	Саранск, 1977, чел-к	ctxA ⁻	-	-
56	М-1268	Магнитогорск, 1994, чел-к	ctxA ⁺	-	-
57	М-1321	Дагестан, с. Аглоби, 1998, чел-к	н/д	-	-
58	М-1331	Чебоксары, 1999, река Волга	н/д	-	-
59	М-1565	Калмыкия, 2019, вода.	н/д	-	-
60	М-1568	Р. Удмуртия, с. Северный, 2020, река Малая Сарапулька	н/д	-	-
61	М-1569	Р. Удмуртия, с. Северный, 2020, проба прудовой воды	н/д	-	-
62	М-1239	Астрахань, 1989, вода	ctxA ⁻	-	-
63	М-1394	Калмыкия, 1979, вода	н/д	-	-
64	М-1398	Астраханская обл., 1981, река Енотаевка	н/д	-	-
65	М-1549	Элиста, 2018, пруд Заячий.	н/д	-	-
66	М-1550	Р. Калмыкия, с. Вознесеновка, 2018, пруд	н/д	-	-
67	М-1554	Элиста, 2018, река Элистинка	н/д	-	-
68	М-1555	Элиста, 2018, пруд Колонский	н/д	-	-
69	М-1533	Республика Крым, г. Ялта, 2016, река Водопадная	н/д	-	-
70	М-1561	Элиста, 2019, пруд Колонский	н/д	-	-
<i>V. cholerae</i> O1 cholerae					
71	266	Индия, 1949	ctxA ⁺	-	-
72	74	Афганистан, Нагту, 1960	ctxA ⁺	-	-
73	М-30	Астрахань, 1941, секц. матер.	ctxA ⁺	-	-
74	5/66	Пакистан, 1966	ctxA	-	-
75	6 Афг.	Афганистан, г. Кабул, 1960	ctxA ⁺	-	-
76	Р-6	Вьетнам	ctxA ⁺	-	-
77	27 Пак	Пакистан, г. Дакка. 1958	ctxA ⁺	-	-
78	27 Корея	Корея, 1947	ctxA ⁺	-	-
79	М-35	Башкортостан, г. Уфа, 1943	ctxA ⁺	-	-
80	33 Дакка	Пакистан, г. Дакка, 1958	н/д	-	-
81	М-29	Астрахань, испр. 6-го, 1942	ctxA ⁺	-	-
82	569 В	Индия, чел-к, 1960	ctxA ⁺	-	-
83	35-а-3	Индия, 1960	н/д	-	-
84	М-41	Башкирия, 1943	ctxA ⁺	-	-
85	1488 а	Индия, 1937	н/д	-	-
<i>V. cholerae</i> не O1 не O139					
1	215	н/д	н/д	-	-
2	498	н/д	н/д	-	-
3	687	н/д	н/д	-	-
4	1109	н/д	н/д	-	-
5	2723	н/д	н/д	-	-
6	3158	н/д	н/д	-	-
7	3419	н/д	н/д	-	-
8	7363	н/д	н/д	-	-
9	8071	н/д	н/д	-	-
10	10429	н/д	н/д	-	-

Примечание: * – литическая активность фагов по 4-балльной системе; ** – нет данных

Для установления диагностической ценности экспериментального фага был проведен детальный анализ полученных результатов в трех направлениях.

Во-первых, был определен общий процент чувствительных штаммов к новому фагу в сравнении с контрольным препаратом (бактериофаг эльтор из коммерческого препарата «Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей»). В ходе испытаний установлено, что из 85 штаммов *V. cholerae* O1 классического и эльтор биоваров:

- экспериментальный фаг лизировал 45,7% (32 из 70) штаммов биовара эльтор и был строго специфичен по отношению к штаммам гетерологичного (классического) биовара;
- коммерческий бактериофаг диагностический холерный эльтор лизировал 40% штаммов *V. cholerae* биовара эльтор (28 из 70) и был строго специфичен в отношении холерных вибрионов классического биовара.

Опытный образец и препарат сравнения не лизировали культуры *V. cholerae* не O1 не O139 серогрупп, что также отмечалось как строгая специфичность препаратов к указанным группам штаммов.

Во-вторых, проведенная оценка спектра литической активности экспериментального фага в отношении штаммов холерного вибриона биовара эльтор, условно разделенных на 2 группы по годам выделения, выявила, что спектр литической активности опытного фага значительно выше в группе микроорганизмов, выделенных в период с 1970–1999 гг. в сравнении со штаммами, выделенными с 2000 по 2020 гг., что составило 50% и 43% соответственно.

В заключение анализ спектра литического действия экспериментального фага и препарата сравнения по каждому штамму отдельно показал, что экспериментальный фаг и препарат сравнения лизируют идентичные штаммы независимо от их генетического профиля, места, времени и источника выделения (см. таблицу 1). Сопоставимые результаты по спектру литической активности экспериментального диагностического холерного фага эльтор жидкого для идентификации холерных вибрионов O1 биовара эльтор, сконструированного в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», и бактериофага эльтор из коммерческого препарата «Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей» производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» указывают на низкий уровень диагностической ценности экспериментального препарата.

Заключение

Полученные результаты дают основание предполагать, что в связи с обнаруженной низкой диагностической ценностью экспериментального фага в ДРТ, обуславливающей специфичность, на практике спектр литической активности такого препарата не будет отличаться в сторону увеличения от коммерческого фага и не повысит качество диагностики холерных вибрионов биовара эльтор. Если рассматривать вопрос изменения состава коммерческого препарата эльтор путем дополнительного введения в его структуру экспериментального фага, то, также опираясь на данные настоящего исследования, это не только не увеличит активность, но и повысит себестоимость конечного продукта в результате увеличения количества специфических компонентов диагностического препарата и соответственно трудозатрат для его производства.

Однако ввиду того, что экспериментальный фаг в цельном виде имеет высокий спектр литической активности, он может быть использован в качестве прототипа активных модификантов при конструировании фаговых препаратов для диагностики холеры эльтор.

Литература

1. Бульканова Е.А., Золотухин С.Н. Выделение бактериофагов рода *Klebsiella* из сточных вод // Вестник УГСХА, серия «Ветеринария». — 2004. — № 12. — С. 40–42.
2. Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры // Клиническая лабораторная диагностика. — 2016. — Т. 61(12). — С. 859–852.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. — Изд. 2-е, переработанное и дополненное. — М.: ЗАО «Шико», 2013. — 560 с.
4. Лабораторная диагностика холеры. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора: МУ 4.2.2218–07, 2007. — 87 с.
5. Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Кутырев В.В., Щербакова С.А., Пакскина Н.Д., Топорков А.В. Актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 1(99). — С. 5–10.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Уткин Д.В. Перспективы применения нанотехнологии и наноматериалов в диагностике, профилактике и лечении особо опасных инфекционных болезней // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2008. — № 6. — С. 93–97.

7. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии // Вестник РАМН. — 2015. — Т. 70(2). — С. 249–256.
8. Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Выделение и селекция бактериофагов рода *Citrobacter* // Вестник ветеринарии, Выпуск V, Оренбург. — 2002. — С. 85–88.
9. Савельев В.Н., Савельева И.В., Бабенышев Б.В., Куличенко А.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль-Тор // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2012. — № 5. — С. 31–35.
10. Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Климушкин Е.И., Белова К.В., Калдыркаев А.И., Сульдина Е.В., Маслюкова К.В., Майоров П.С., Юдина Т.Г., Павлова И.Б., Обухов И.Л., Швиденко И.Г. Выделение, изучение основных биологических свойств бактериофага *Bacillus anthracis* и конструирование на его основе экспериментального биопрепарата // Современные проблемы науки и образования. — 2016. — № 5. — С. 312.
1. Bul'kanova YeA, Zolotukhin SN. Vydeleniye bakteriofagov roda *Klebsiella* iz stochnykh vod. Vestnik UGSKHA, seriya «Veterinariya» 2004; 12:40–42 (in Russian).
2. Gayevskaya NYe, Makedonova LD. Ispol'zovaniye bakteriofagov v laboratornoy diagnostike kholery. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2016; 61(12):859–852 (in Russian).
3. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney. Prakticheskoye rukovodstvo. Pod red akademika RAMN GG Onishchenko, akademika RAMN VV Kutyreva. Izd 2-ye, pererabotannoye i dopolnennoye. Moscow: ZAO «Shiko», 2013: 560 (in Russian).
4. Laboratornaya diagnostika kholery. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora: MU 4.2.2218–07, 2007: 87 (in Russian).
5. Onishchenko GG, Kuz'kin BP, Kutuyev VV, Shcherbakova SA, Paksina ND, Toporkov AV. Aktual'nyye napravleniya sovershenstvovaniya laboratornoy diagnostiki osobo opasnykh infektsionnykh bolezney. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2009; 1(99):5–10 (in Russian).
6. Onishchenko GG, Kutuyev VV, Utkin DV. Perspektivy primeneniya nanotekhnologii i nanomaterialov v diagnostike, profilaktike i lechenii osobo opasnykh infektsionnykh bolezney. Zhurn mikrobiol, epidemiol i immunobiol 2008; 6:93–97 (in Russian).
7. Onishchenko GG, Moskvitina EA, Kruglikov VD, Titova SV, Adamenko OL, Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO. Epidemiologicheskyy nadzor za kholeroy v Rossii v period sed'moy pandemii Vestnik RAMN 2015; 70(2):249–256 (in Russian).
8. Pul'cherovskaya LP, Zolotukhin SN, Vasil'yev DA. Vydeleniye i selektsiya bakteriofagov roda *Sitrobacterio* Vestnik veterinarii, Vypusk V, Orenburg 2002: 85–88 (in Russian).
9. Savel'yev VN, Savel'yeva IV, Babenyshev BV, Kulichenko AN. Evolyutsiya vzbuditelya i kliniko-epidemiologicheskoye osobennosti sovremennoy kholery El'-Tor. Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni 2012; 5:31–35 (in Russian).
10. Feoktistova NA, Vasil'yev DA, Zolotukhin SN, Klimushkin YeI, Belova KV, Kaldyrkayev AI, Sul'dina YeV, Maslyukova KV, Mayorov PS, Yudina TG, Pavlova IB, Obukhov IL, Shvidenko IG. Vydeleniye, izucheniye osnovnykh biologicheskikh svoystv bakteriofaga *Bacillus anthracis* i konstruirovaniye na yego osnove eksperimental'nogo biopreparata. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya 2016; 5:312 (in Russian).

References

EVALUATION OF THE TEST RESULTS OF AN EXPERIMENTAL PHAGE FOR THE DIAGNOSIS OF CHOLERA EL TOR

K.S. GUMAYUNOVA¹, O.S. ZININA¹, M.V. OVCHINNIKOVA¹, N.E. GAEVSKAYA²,
Yu.V. SINYAGINA¹, A.K. NIKIFOROV¹

¹ Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov;

² Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

The high specificity, rapidity and availability of the phage method determine its demand in the scheme of laboratory diagnostics of causative agents of dangerous infectious diseases. Currently, the commercial preparation Bacteriophages Diagnostic Cholera Classic and El Tor, Lyophilisate for Diagnostic Purposes used to determine the biovar of *Vibrio cholerae* does not always meet the task of identifying the studied microorganisms, due to the high level of adaptation of the pathogen to changing environmental conditions. In this regard, in order to improve the phage method, an experimental diagnostic phage preparation for the identification of *V. cholerae* O1 biovar El Tor was designed at the Rostov-on-Don Antiplague Institute. The aim of this work was to determine the spectrum of lytic activity and specificity of the experimental phage in order to establish its diagnostic value. We used 95 strains from the State collection

of pathogenic bacteria «Microbe» (Saratov), which have typical cultural, morphological, biochemical and serological properties. It was found that of 85 strains of *V. cholerae* O1 classical and El Tor biovar, the experimental phage and the reference drug (commercial phage El Tor) lysed 45.7% and 40% of the biovar El Tor strains, respectively. It was noted that the preparations were strictly specific with respect to strains of the heterologous biovar and cultures of *V. cholerae* not O1 not O139 serogroups. Analysis of the spectrum of lytic activity showed that the experimental phage in the diagnostic working titer (DWT) and the reference drug acted identically on the strains taken in the experiment, regardless of their genetic profile, geographic location, time and place of isolation, which indicates a low diagnostic value of the new phage. However, the whole experimental preparation can be used as a prototype of active phage modifiers in the design of new phage preparations to improve the diagnosis of *Vibrio cholerae* biovar El Tor.

Keywords: cholera; bacteriophages; improvement of diagnostics; specific activity; specificity.

Address:

Ovchinnikova M.V., Ph.D.
Head of the laboratory of diagnostic preparations
Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
E-mail: begemot2006@list.ru

Для цитирования:

Гумаюнова К.С., Зинина О.С., Овчинникова М.В., Гаевская Н.Е., Синягина Ю.В., Никифоров А.К.. Оценка результатов испытаний экспериментального фага для диагностики холеры эльтор. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(4):34–40.

For citation:

Gumayunova K.S., Zinina O.S., Ovchinnikova M.V., Gaevskaya N.E., Sinyagina Yu.V., Nikiforov A.K. Evaluation of the test results of an experimental phage for the diagnosis of Cholera El Tor. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(4):34–40 (in Russian).

СТРУКТУРА ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ

О.Н. КОЛОТОВА*, Л.В. КАТАЕВА, И.В. БАКШТАНОВСКАЯ,
Т.Ф. СТЕПАНОВА, К.Б. СТЕПАНОВА

ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии»
Роспотребнадзора, Тюмень

Проанализирован видовой состав грамположительных бактерий, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей от пациентов с диагнозом «Внебольничная пневмония». Идентификацию культур проводили бактериологическим, масс-спектрометрическим и ПЦР-методами. Определение резистентности к антимикробным препаратам осуществляли диско-диффузионным методом. Показано, что штаммы *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium* обладают высоким уровнем резистентности к антибактериальным препаратам, что свидетельствует об их этиологической значимости. Данный факт подтверждает необходимость бактериологического исследования мокроты для коррекции схем лечения.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, SARS-CoV-2, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, мокрота, антибиотикорезистентность.

Введение

Новая коронавирусная инфекция зарегистрирована в большинстве стран мира и приобрела характер пандемии [16]. Высокая доля осложненных и затяжных случаев связана с внебольничной пневмонией (ВП) [17, 21, 22, 26, 27]. Этиологическим фактором ВП может быть как ассоциация различных бактериальных возбудителей, так и их сочетание с респираторными вирусами. Частота встречаемости ВП, вызванной ассоциацией возбудителей, варьирует от 3 до 40% [10]. По данным статистики, риск летального исхода при ВП, вызванной вирусом SARS-CoV-2, составляет 40% [3, 11]. Одним из ведущих симптомов COVID-19 является резкое снижение иммунного статуса организма и как следствие — развитие вторичной бактериальной пневмонии [5, 13, 14, 24, 25]. При этом присоединение возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью не только снижает эффективность антибактериальной терапии, но и повышает риск тяжелого течения и неблагоприятного исхода болезни [12, 15, 20]. Не менее негативным фактором является вероят-

ность присоединения грибковой микрофлоры с развитием микотического поражения легочной ткани [5, 9, 18]. Показатель летальности пациентов, у которых отсутствуют признаки «ответа» на проводимую терапию, достигает 30–40% [18]. Поэтому на протяжении всего периода лечения пациента необходимы микробиологические исследования отделяемого нижних дыхательных путей с целью идентификации инфекционного агента и определения его резистентности к антимикробным препаратам (АМП). Это поможет скорректировать адекватную схему лечения, предотвратить появление панрезистентных бактериальных клонов [2, 12, 19].

Цель работы — изучение структуры грамположительных бактерий, выделенных из мокроты и промывных вод бронхов у пациентов с диагнозом внебольничной пневмонии, в том числе ассоциированной с COVID-19, и определение их спектра резистентности к антимикробным препаратам.

Материалы и методы

В исследование были включены 2031 образец мокроты и промывных вод бронхов от пациентов, находившихся на стационарном лечении в многопрофильных г. Тюмени и Тюменской области с подтвержденным диагнозом внебольничной пневмонии различной степени тяжести. Средний возраст пациентов составил 60,2 лет, сроки пребывания в стационаре — от 2 суток до 4 месяцев. Клинический материал получен в период с мая 2020 по июнь 2021 гг.

© 2021 г. Колотова О.Н., Катаева Л.В., Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б.

* **Автор для переписки:**

Колотова Ольга Николаевна
младший научный сотрудник бактериологической лаборатории
ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой
инфекционной патологии» Роспотребнадзора, г. Тюмень
E-mail: colotova.ol@yandex.ru

Отбор и транспортировка биологического материала для лабораторного исследования проводились в соответствии с требованиями законодательства РФ в отношении возбудителей инфекционных заболеваний человека I–II групп патогенности [11].

Проведено микроскопическое исследование мокроты, окрашенной по Граму. Для культивирования бактерий рода *Streptococcus* осуществлен посев клинических образцов в объеме 0,1 мл из третьего разведения (для промывных вод бронхов) и из четвертого и пятого разведений (для мокроты) на агар с дефибринированной кровью барана (5%), обогащённый лошадиной сывороткой, и шоколадный агар. Эти же среды использовали для подсчета и идентификации бактерий *Enterococcus spp.* Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24–48 ч. в CO₂-инкубаторе. Для культивирования *Staphylococcus spp.* клинический образец высевали на желточно-солевой агар в объеме 0,1 мл из первого разведения. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24–48 часов.

Выросшие на плотных питательных средах колонии идентифицировали с помощью времяпролетной масс-спектрометрии на приборе microflex MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) с программным обеспечением BioTyper 3.0. Для подтверждения идентификации *S. pneumoniae* использовали индикаторные диски с оптохином 6 мкг («НИЦФ», Россия) и набор латексной агглютинации Dry Spot Pneumo («OXOID», Великобритания).

Параллельно с бактериологическим методом для обнаружения ДНК *S. pneumoniae* биологический материал исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Для этого использовали «Набор для выявления ДНК *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *S. pneumoniae* «АмплиСенс»» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия).

Для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 пробы исследовали методом ПЦР наборами: тест-система Вектор-ПЦР_{рв-2019-пCoV-RG} (ГНЦ «Вектор», Россия), SARS-CoV-2/SARS-CoV («ДНК-технология», Россия).

Резистентность к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллер – Хинтон (HiMedia, Индия), результаты анализировали в соответствии с действующими нормативными документами (Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» Версия – 2018-03 и МУК 4.2.1890-04).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования биологических проб от пациентов с диагнозом внебольничная пневмония положительный результат ПЦР исследования SARS-CoV-2 подтвержден в 1403 случаях (69,1%). Бактериологический анализ в 236 случаях показал отсутствие роста бактерий и грибов на всех дифференциально-диагностических средах. Грамположительная микробиота отделяемого нижних дыхательных путей представлена бактериями родов *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* (табл. 1).

Таблица 1

Видовая характеристика грамположительных бактерий, выделенных из содержимого нижних дыхательных путей, в зависимости от лабораторного подтверждения SARS-CoV-2

Виды микроорганизмов	SARS-CoV-2 обнаружен		SARS-CoV-2 не обнаружен	
	Абс. число	% ± m	Абс. число	% ± m
<i>Streptococcus spp.</i>	692	100	259	100
<i>S. pneumoniae</i>	11	1,6±0,5	7	2,7±1,0
<i>S. mitis</i>	285	41,2±1,9	91	35,1±3,0
<i>S. parasanguinis</i>	134	19,4±1,5	47	18,1±2,4
<i>S. oralis</i>	109	15,8±1,4	47	18,1±2,4
<i>S. vestibularis</i>	94	13,6±1,3	49	18,9±2,4
<i>S. salivarius</i>	21	3,0±0,6	8	3,1±1,1
<i>S. peroris</i>	20	2,9±0,6	1	0,4±0,4
<i>S. infantis</i>	10	1,4±0,4	3	1,2±0,7
<i>S. sanguinis</i>	5	0,7±0,3	2	0,8±0,5
<i>S. anginosus</i>	3	0,4±0,2	2	0,8±0,5
<i>S. crispatus</i>	0	-	1	0,4±0,4
<i>S. disgalactia</i>	0	-	1	0,4±0,4
<i>Staphylococcus spp.</i>	158	100	58	100
<i>S. aureus</i>	55	34,8±3,8	33	57,0±6,5
<i>S. haemolyticus</i>	49	31,0±3,7	22	37,9±6,4
<i>S. epidermidis</i>	28	17,7±3,0	2	3,4±2,4
<i>S. hominis</i>	15	9,5±2,3	0	-
<i>S. warneri</i>	11	7,0±2,0	1	1,7±1,7
<i>Enterococcus spp.</i>	94	100	39	100
<i>E. faecium</i>	55	58,5±5,1	24	61,5±7,8
<i>E. faecalis</i>	37	39,4±5,0	13	33,3±7,5
<i>E. durans</i>	2	2,1±1,5	1	2,6±2,5
<i>E. raffinosus</i>	0	-	1	2,6±2,5

Результаты исследования продемонстрировали, что ведущее место среди грамположительных кокков занимают бактерии рода *Streptococcus*. Чаще встречается вид *S. mitis*, относящийся к группе зеленеющих стрептококков. Причем, в пробах от ковид-позитивных пациентов процент встречаемости выше, чем у ковид-негативных; статистически достоверных различий не выявлено. У ковид-позитивных пациентов *Streptococcus spp.* идентифицированы в 49,3% проб отделяемого нижних дыхательных путей, у ковид-негативных — в 41,2%.

В ассоциации с *Streptococcus spp.* чаще всего изолированы грибы рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) до 77%, реже — грамотрицательные бактерии — 27,5% и грамположительные кокки — 13,2% (рис. 1). Бактерии семейства *Enterobacterales* представлены видами *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, неферментирующие грамотрицательные бактерии — *Acinetobacter spp.* (преимущественно *A. baumannii*), *Pseudomonas aeruginosa*.

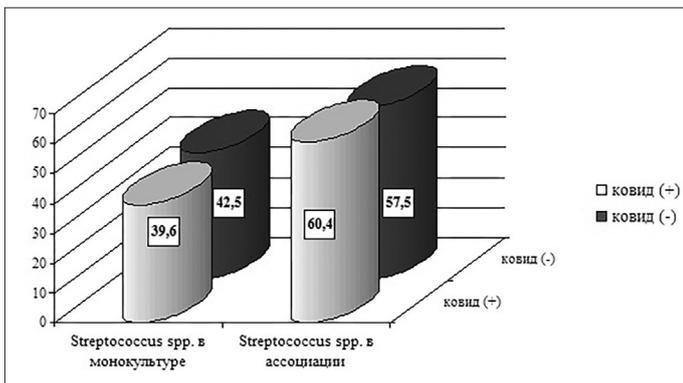


Рис. 1. Частота встречаемости *Streptococcus spp.* в мокроте пациентов с диагнозом внебольничной пневмонии (%)

По данным литературы, основным бактериальным возбудителем внебольничных пневмоний является *S. pneumoniae* [4, 8]. Результаты нашего исследования показали низкую частоту выявляемости *S. pneumoniae* в содержимом нижних дыхательных путей. Так, из всех проб от ковид-положительных пациентов штаммы *S. pneumoniae* идентифицированы в 1,6% случаев, у ковид-негативных пациентов — в 2,7%. Параллельно с бактериологическим методом для подтверждения полученных данных пробы биоматериала исследованы методом ПЦР. В работу были включены 192 пробы от ковид-положительных пациентов и 116 проб с отрицательным результатом SARS-CoV-2. Положительные результаты на наличие ДНК бактерий *S. pneumoniae* выявлены в 63 пробах у ковид-положительных пациентов, бактериологическое подтверждение получили 3 случая. У ковид-негативных пациентов ПЦР тест положителен в 38 пробах, из них культуральный рост регистрировался только в двух (рис. 2).

Значимые различия результатов методов выявления *S. pneumoniae* могут быть объяснены несколькими причинами. Прежде всего, на исследование доставлялся биоматериал от пациентов, принимающих антимикробную терапию, что отражается на жизнеспособности бактерий. Средний возраст пациентов, взятых нами в исследование, составлял 60,2 лет, в то время как, по данным литературы

[7], *S. pneumoniae* выявляются преимущественно у молодых пациентов без сопутствующей патологии и при легком течении заболевания. Кроме того, метод ПЦР характеризуется высокой чувствительностью, что позволяет выявить единственную бактериальную клетку среди миллиардов других, а в бактериологическом методе клинически значимым считается определенное количество: для мокроты более или равно 10^5 КОЕ/мл, для бронхоальвеолярного лаважа — более или равно 10^4 КОЕ/мл. Следовательно, делать вывод о том, что возбудителем пневмонии является *S. pneumoniae*, основываясь только на результатах ПЦР-метода, на наш взгляд, некорректно.

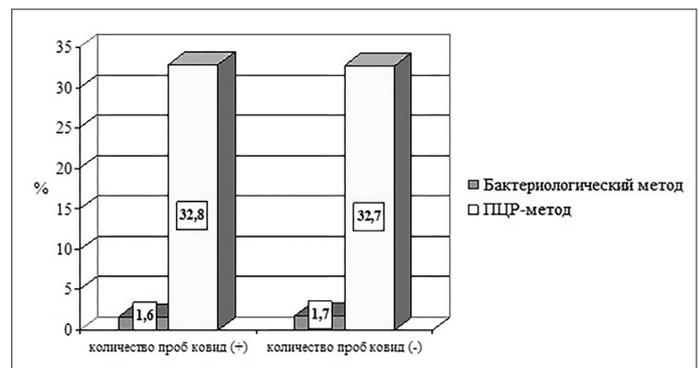


Рис. 2. Частота обнаружения *S. pneumoniae* классическим бактериологическим методом и методом ПЦР

По данным литературы [1, 6, 9, 23], большинство штаммов *S. pneumoniae* (до 95%) сохраняет высокую чувствительность к β -лактамам (ампициллин) и пеницилиназа-защищенным препаратам (амоксиклав). Анализ полученных нами результатов выявил, что штаммы *S. pneumoniae*, изолированные из мокроты ковид-негативных пациентов, обладали повышенной резистентностью к указанным выше препаратам. *S. pneumoniae* ковид-положительных пациентов в 100% случаев обладали чувствительностью к цефотаксиму, клиндамицину (рис. 3).

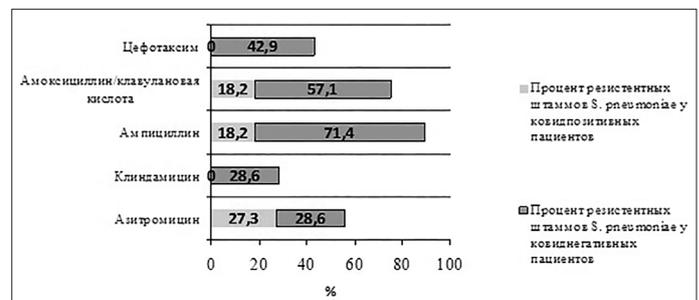


Рис. 3. Уровень резистентности штаммов *S. pneumoniae* к антимикробным препаратам в зависимости от ковид-принадлежности пациентов

Результаты изучения устойчивости к антимикробным препаратам штаммов *Streptococcus spp.*, изолированных из отделяемого нижних дыхательных путей, представлены в таблице 2. Исследования показали, что более 70% штаммов *Streptococcus spp.* проявляли резистентность к ампициллину, вне зависимости от статуса ковид-принадлежности. Более половины штаммов обладало устойчивостью к амоксициллин/клавулановой кислоте. Минимальная резистентность отмечена к клиндамицину. Менее 60% штаммов обнаруживали резистентность к цефотаксиму.

Таблица 2
Резистентность штаммов *Streptococcus spp.* к антимикробным препаратам

АМП	SARS-CoV-2 положительные (n=692)		SARS-CoV-2 отрицательные (n=259)	
	Абс. число	%±m	Абс. число	%±m
Клиндамицин	140	20,2±1,5	66	25,5±2,7
Ампициллин	496	71,7±1,7	190	73,4±2,7
Амоксициллин/клавулановая кислота	367	53,0±1,9	157	60,6±3,9
Цефотаксим	306	44,2±1,9	118	45,6±3,1

Штаммы *S. aureus*, обладающие MRSA, в 1,5 раза чаще идентифицировали из образцов мокроты ковид-негативных пациентов. Среди проанализированных показателей резистентности коагулазонегативных стафилококков лидирующее положение занимал *S. haemolyticus*. Несмотря на то, что частота обнаружения его составляет не более 4%, устойчивостью к эритромицину, амоксициллин/клавулановой кислоте, ципрофлоксацину и карбапенемам обладали более 70% штаммов. Причем, у ковид-позитивных пациентов эти показатели несколько выше (табл. 3).

Высокий уровень полирезистентности отмечен у штаммов *E. faecium*. Так, 90% *E. faecium*, изолированных из мокроты ковид-позитивных пациентов, проявляли устойчивость к ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, амоксициллин/сульбактаму, ципрофлоксацину. Почти в 2 раза меньше процент устойчивых штаммов *E. faecalis* (кроме ципрофлоксацина). У ковид-негативных пациентов количество резистентных штаммов *Enterococcus spp.* превышает 50% (табл. 4). Виды *E. durans* и *E. raffinosus* изолированы в единичных случаях и обладали чувствительностью ко всем исследуемым нами препаратам. Штаммов *Enterococcus*

spp., обладающих ванкомицинрезистентностью, не выявлено.

Таблица 3
Резистентность к антимикробным препаратам штаммов бактерий *Staphylococcus spp.*, (%)

АМП	SARS-CoV-2 обнаружен		SARS-CoV-2 не обнаружен	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
Эритромицин	14,5	85,7	12,1	77,3
Клиндамицин	10,9	39,6	12,1	36,4
Амикацин	0	16,3	3,0	4,5
Ципрофлоксацин	10,9	83,7	15,1	77,3
Амоксициллин/клавулановая кислота	5,4	85,7	9,1	72,7
Имипенем	5,4	85,7	9,1	72,7
Меропенем	5,4	85,7	9,1	72,7
MRSA, MRS	5,4	85,7	9,1	72,7

Таблица 4
Резистентность к антимикробным препаратам штаммов бактерий *Enterococcus spp.* (%)

АМП	SARS-CoV-2 обнаружен		SARS-CoV-2 не обнаружен	
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Ампициллин	90,9	48,6	66,7	53,8
Амоксициллин/клавулановая кислота	90,9	48,6	66,7	53,8
Амоксициллин/сульбактам	90,9	48,6	66,7	53,8
Ципрофлоксацин	90,9	78,4	66,7	69,2
Гентамицин	87,3	67,57	66,7	53,8
Ванкомицин	0	0	0	0

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что выделяемая грамположительная микробиота, обладающая высокой степенью устойчивости к антимикробным препаратам (*Streptococcus spp.*, *S. haemolyticus*, *E. faecium*), дает основания считать ее возбудителем внебольничной пневмонии. Фактором риска неблагоприятного исхода пневмонии является выделение возбудителей, обладающих множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. Учитывая, что в популяции

бактерий происходит постоянный процесс эволюции клональных комплексов, приводящих к горизонтальному обмену генами, кодирующими вирулентность, проведение микробного мониторинга мокроты при внебольничной пневмонии позволит своевременно выявлять структуру и резистентность микробиоты. Определение этиологически значимых возбудителей повысит эффективность антибиотикотерапии.

Литература

1. Баязитова Л.Т., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А., Тюрин Ю.А., Исаева Г.Ш., Зарипова А.З., Патяшина М.А., Авдонина Л.Г., Юзлибаева Л.Р. Внебольничные пневмонии пневмококковой этиологии и микробиологические аспекты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* в Республике Татарстан // Инфекции и иммунитет. — 2017. — Т. 7. — № 3. — С. 271–278.
2. Бондаренко А.П., Шмыленко В.А., Троценко О.Е., Котова В.О., Бутакова Л.В., Базыкина Е.А. Характеристика бактериальной микрофлоры, выделенной из проб мокроты больных пневмонией в Хабаровске и Хабаровском крае в начальный период пандемии COVID-19 (май-июнь 2020 г.) // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 3. — С. 43–49.
3. Веселова Е.И., Русских А.Е., Каминский Г.Д., Ловачева О.В., Самойлова А.Г., Васильева И.А. Новая коронавирусная инфекция // Туберкулез и болезни легких. — 2020. — Т. 98. — № 4. — С. 6–14.
4. Голубкова А.А., Сомова А.В. Роль *Streptococcus pneumoniae* в этиологии внебольничных пневмоний в крупном промышленном регионе Российской Федерации // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2018. — Т. 3. — № 73. — С. 29–33.
5. Зайцев А.А., Синопальников А.И. «Трудная» пневмония // Терапевтический архив. — 2021. — Т. 93. — № 3. — С. 300–310.
6. Зарипова А.З., Валиева Р.И., Баязитова Л.Т., Целищева М.В. Диагностика пневмококковых инфекций респираторного тракта // Практическая пульмонология. — 2018. — № 4. — С. 74–80.
7. Захаренков И.А., Рачина С.А., Дехнич Н.Н., Козлов Р.С., Синопальников А.И., Иванчик Н.В., Яцышина С.Б., Елькина М.А., Архипенко М.В., Гордеева С.А., Лебедева М.С., Портнягина У.С. Этиология тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых: результаты первого российского многоцентрового исследования // Терапевтический архив 1. — 2020. — С. 36–42.
8. МР 4.2.0114-16. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии.
9. Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Аронова Н.В., Анисимова А.С., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Гудуева Е.Н., Сагакянц М.М., Ковалев Е.В., Носков А.К. Внебольничные пневмонии бактериальной этиологии и спектр чувствительности возбудителей к антибиотикам у коронапозитивных и коронанегативных больных г. Ростова-на-Дону // Антибиотики и химиотерапия. — 2021. — Т. 66(1–2). — С. 26–32.
10. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Носков А.К., Ковалев Е.В., Чемисова О.С., Твердохлебова Т.И., Павлович Н.В., Водопьянов С.О., Цимбалистова М.В., Гаевская Н.Е., Воловикова С.В., Стенина С.И., Гудуева Е.Н., Сагакянц М.М., Алешукина А.В., Слись С.С. Особенности этиологии внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19 // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 4. — С. 99–105.
11. СП 3.1.3597-20. Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19).
12. Aitken S.L., Clancy C.J. Guidance on the treatment of antimicrobial resistant gram-negative infections // Contagion. — 2020. — Vol. 5(6). — P. 22–23.
13. Arastehfar A., Carvalho A., van de Veerdonk F.L., Jeray D., Jenks, Koehler P., Krause R. et al. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA) — from immunology to treatment // Journal of Fungi (Basel, Switzerland). — 2020. — Vol. 6(2). — P. 91. doi: 10.3390/jof6020091.
14. Baig A.M. Neurological manifestations in COVID-19 caused by SARS-CoV-2 // CNS Neuroscience and Therapeutics. — 2020. — Vol. 5(26). — P. 499–501.
15. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study // Lancet. — 2020. — Vol. 395. — P. 507–513.
16. Dong Y., Zhou H., Li M., Zhang Z., Guo W., Yu T., Hu D. A novel simple scoring model for predicting severity of patients with SARS-CoV-2 infection // Transboundary and Emerging Diseases. — 2020. — Vol. 67(6). — P. 2823–2829.
17. Du Toit A. Measles increases the risk of other infections // Nat. Rev. Microbiol. — 2019. — Vol. 18(1). — Art. 2. doi: 10.1038/s41579-019-0301-7.
18. Ewig S., de Roux A., Bauer T., et al. Validation of predictive rules and indices of severity for community acquired pneumonia // Thorax. — 2004. — Vol. 59. — P. 421–427.
19. Lee C-R., Cho H., Jeong B.C., Lee C.H. Strategies to minimize antibiotic resistance // Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2013. — Vol. 10(9). — P. 4274–4305.
20. Menendez R., Torres A., Zalacain R., et al. Risk factors of treatment failure in community acquired pneumonia: implications for disease outcome // Thorax. — 2004. — Vol. 59. — P. 960–965.
21. Pan Y., Zhang D., Yang P. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples // Lancet Infectious Diseases. — 2020. — Vol. 4(20). — P. 411–412.
22. Reusken C.B.E.M., Broberg E.K., Haagmans B. et al. Laboratory readiness and response for novel coronavirus (2019-

- nCoV) in expert laboratories in 30 EU/EEA countries // EuroSurveill. — 2020. — Vol. 25(6). — Art. 2000082. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000082.
23. Sattar S.B.A., Sharma S. Bacterial Pneumonia / In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. — 2020. — Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513321>.
 24. Tay M.Z., Poh C.M., Renia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention // Nat. Rev. Immunol. — 2020. — Vol. 20(6). — P. 363–374.
 25. Zheng Y.Y., Ma Y.T., Zhang J.Y. COVID-19 and the cardiovascular system // Nature Reviews Cardiology. — 2020. — Vol. 5(17). — P. 259–260.
 26. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // Nature. — 2020. — Vol. 7798(579). — P. 270–273.
 27. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J. A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 // N. Engl. J. Med. — 2020. — Vol. 382. — P. 727–733.
- ## References
1. Bayazitova LT, Tyupkina OF, Chazova TA, Tyurin YuA, Isayeva GSh, Zaripova AZ, Patyashina MA, Avdonina LG, Yuzlibayeva LR. Vnebol'nichnyye pnevmonii pnevmokokkovoy etiologii i mikrobiologicheskiye aspekty nazofaringeal'nogo nositel'stva Streptococcus pneumoniae v Respublike Tatarstan. Infektsii i immunitet 2017; 7(3):271–278 (in Russian).
 2. Bondarenko AP, Shmylenko VA, Trotsenko OYe, Kottova VO, Butakova LV, Bazykina YeA. Kharakteristika bakterial'noy mikroflory, vydelennoy iz prob mokroty bol'nykh pnevmoniyey v Khabarovske i Khabarovskom kraye v nachal'nyy period pandemii COVID-19 (may-iyun' 2020 g). Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 3:43–49 (in Russian).
 3. Veselova YeI, Russkikh AYe, Kaminskiy GD, Lovacheva OV, Samoylova AG, Vasil'yeva IA. Novaya koronavirusnaya infektsiya. Tuberkulez i bolezni legkikh 2020; 98(4):6–14 (in Russian).
 4. Golubkova AA, Somova AV. Rol' Streptococcus pneumoniae v etiologii vnebol'nichnykh pnevmoniy v krupnom promyshlennom regione Rossiyskoy Federatsii. Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal 2018; 3(73):29–33 (in Russian).
 5. Zaytsev AA, Sinopal'nikov AI. «Trudnaya» pnevmoniya. Terapevticheskiy arkhiv 2021; 93(3):300–310 (in Russian).
 6. Zaripova AZ, Valiyeva RI, Bayazitova LT, Tselishcheva MV. Diagnostika pnevmokokkovykh infektsiy respiratornogo trakta. Prakticheskaya pul'monologiya 2018; 4:74–80 (in Russian).
 7. Zakharenkov IA, Rachina SA, Dekhnich NN, Kozlov RS, Sinopal'nikov AI, Ivanchik NV, Yatsyshina SB, Yel'kina MA, Arkhipenko MV, Gordeyeva SA, Lebedeva MS, Portnyagina US. Etiologiya tyazhelyo vnebol'nichnoy pnevmonii u vzroslykh: rezul'taty pervogo rossiyskogo mnogotsentrovogo issledovaniya. Terapevticheskiy arkhiv 1. 2020: 36–42 (in Russian).
 8. MR 4.2.0114-16. Laboratornaya diagnostika vnebol'nichnoy pnevmonii pnevmokokkovoy etiologii (in Russian).
 9. Pavlovich NV, Tsimbalistova MV, Aronova NV, Anisimova AS, Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Guduyeva YeN, Sagakyants MM, Kovalev YeV, Noskov AK. Vnebol'nichnyye pnevmonii bakterial'noy etiologii i spektr chuvstvitel'nosti vzbuditeley k antibiotikam u koronapozitivnykh i koronanegativnykh bol'nykh g. Rostova-na-Donu. Antibiotiki i khimioterapiya 2021; 66(1–2):26–32 (in Russian).
 10. Popova AYu, Yezhlova YeB, Demina YuV, Noskov AK, Kovalev YeV, Chemisova OS, Tverdokhlebova TI, Pavlovich NV, Vodop'yanov SO, Tsimbalistova MV, Gayevskaya NYe, Volovikova SV, Stenina SI, Guduyeva YeN, Sagakyants MM, Aleshukina AV, Slis' SS. Osobennosti etiologii vnebol'nichnykh pnevmoniy, assotsirovannykh s COVID-19. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 4:99–105 (in Russian).
 11. SP 3.1.3597-20. Profilaktika novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19) (in Russian).
 12. Aitken SL, Clancy CJ. Guidance on the treatment of antimicrobial resistant gram-negative infections. Contagion 2020; 5(6):22–23.
 13. Arastehfar A, Carvalho A, van de Veerdonk FL, Jeray D, Jenks, Koehler P, Krause R et al. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA) – from immunology to treatment. Journal of Fungi (Basel, Switzerland) 2020; 6(2):91. doi: 10.3390/jof6020091.
 14. Baig AM. Neurological manifestations in COVID-19 caused by SARS-CoV-2. CNS Neuroscience and Therapeutics 2020; 5(26):499–501.
 15. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet 2020; 395:507–513.
 16. Dong Y, Zhou H, Li M, Zhang Z, Guo W, Yu T, Hu D. A novel simple scoring model for predicting severity of patients with SARS-CoV-2 infection. Transboundary and Emerging Diseases 2020; 67(6):2823–2829.
 17. Du Toit A. Measles increases the risk of other infections. Nat. Rev. Microbiol 2019; 18(1): 2. doi: 10.1038/s41579-019-0301-7.
 18. Ewig S, de Roux A, Bauer T, et al. Validation of predictive rules and indices of severity for community acquired pneumonia. Thorax 2004; 59:421–427.
 19. Lee C-R, Cho H, Jeong BC, Lee CH. Strategies to minimize antibiotic resistance. Int J Environ Res Public Health 2013; 10(9):4274–4305.

20. Menendez R, Torres A, Zalacain R, et al. Risk factors of treatment failure in community acquired pneumonia: implications for disease outcome. *Thorax* 2004; 59:960–965.
21. Pan Y, Zhang D, Yang P. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infectious Diseases* 2020; 4(20):411–412.
22. Reusken CBEM, Broberg EK, Haagmans B et al. Laboratory readiness and response for novel coronavirus (2019-nCoV) in expert laboratories in 30 EU/EEA countries. *EuroSurveill* 2020; 25(6):2000082. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000082.
23. Sattar SBA, Sharma S. Bacterial Pneumonia. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2020; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513321>.
24. Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020; 20(6):363–374.
25. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature Reviews Cardiology* 2020; 5(17):259–260.
26. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 7798(579):270–273.
27. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J. A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382:727–733.

THE STRUCTURE OF GRAM-POSITIVE BACTERIA ISOLATED FROM PATIENTS WITH A DIAGNOSIS OF COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

O.N. KOLOTOVA, L.V. KATAEVA, I.V. BAKSHTANOVSKAYA,
T.F. STEPANOVA, K.B. STEPANOVA

Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology of the Rospotrebnadzor, Tyumen

The species composition of gram-positive bacteria isolated from the discharge of the lower respiratory tract from patients diagnosed with community-acquired pneumonia was analyzed. The cultures were identified by bacteriological, mass spectrometric, and PCR methods. Determination of resistance to antimicrobial drugs was realized by the disk-diffusion method. It has been shown that strains *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium* have a high level of resistance to antibacterial drugs. This fact confirms the need for bacteriological examination of sputum for the correction of treatment regimens.

Keywords: community-acquired pneumonia, SARS-CoV-2, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, Sputum, antibiotic resistance.

Address:

Kolotova O.N.
Junior Researcher Bacteriological Laboratory, Tyumen Research Institute
of Regional Infectious Pathology of the Rospotrebnadzor
E-mail: colotova.ol@yandex.ru.

Для цитирования:

Колотова О.Н., Катаева Л.В., Бакштановская И.В., Степанова Т.Ф., Степанова К.Б. Структура грамположительных бактерий, изолированных от пациентов с диагнозом внебольничной пневмонии. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2021; 17(4):41–47.

For citation:

Kolotova O.N., Kataeva L.V., Bakshtanovskaya I.V., Stepanova T.F., Stepanova K.B. The structure of gram-positive bacteria isolated from patients with a diagnosis of community-acquired pneumonia. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(4):41–47 (in Russian).

ПРОДУЦИРОВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛАЗ АСКОМИЦЕТНЫМ ГРИБОМ *TRICHODERMA VIRIDE* ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ В КОЛЛЕКЦИИ

А.А. ШУБАКОВ^{1*}, С.О. ВОЛОДИНА¹, В.В. МАРТЫНОВ¹,
Н.Н. ШЕРГИНА^{1,2}, В.В. ВОЛОДИН¹

¹Институт биологии Коми научного центра УрО РАН,

²ФГБУ ВО «Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина», Сыктывкар

Исследованы особенности продуцирования целлюлаз культурами *Trichoderma viride* штамм 44 и *T. viride* штамм 13/10 в процессе их глубинного культивирования на среде Чапека после длительного (25 лет) хранения штаммов в коллекции. Показано, что наиболее активным ростом в среде Чапека с лактозой и с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ) обладает штамм 13/10. Штамм 13/10 продуцирует больше целлюлаз по сравнению со штаммом 44. При росте на 3%-ной лактозе и на 1%-ной МКЦ общая целлюлазная активность по осахариванию фильтровальной бумаги (АФБ) штамма 13/10 составляет соответственно 1,9–2,3 ед/мл и 0,14–0,17 ед/мл. Ниже уровень АФБ у штамма 44. В процессе роста штаммов карбоксиметилцеллюлазная активность (КМЦ-аза) увеличивается и наибольшая активность фермента обнаруживается у штамма 13/10 как на 3%-ной лактозе (7,2 ед/мл), так и на 1%-ной МКЦ (6,5 ед/мл). КМЦ-азная активность штамма 44 при росте на обоих источниках углерода существенно ниже и не превышает 1,7 ед/мл при росте на 3%-ной лактозе.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, *Trichoderma viride*, штаммы, культивирование, продуцирование целлюлаз, целлюлазная активность, активность по осахариванию фильтровальной бумаги, карбоксиметилцеллюлазная активность.

Введение

Целлюлазы занимают третье место среди самых важных промышленных ферментов мирового рынка ($\approx 15\%$) после амилазы ($\approx 25\%$) и протеазы ($\approx 18\%$). Целлюлазы используются в целлюлозно-бумажной и текстильной промышленности для улучшения качества волокон, пищевых продуктов и обогащения кормов легкоусвояемыми углеводами. Высокоактивные целлюлазы используются в генетической инженерии для получения протопластов. Растет интерес к промышленному использованию целлюлаз при получении биотоплива второго поколения из непищевого лигноцеллюлозного сырья [11].

Ферментативный гидролиз целлюлозы происходит в результате последовательно-параллельного действия нескольких ферментов, входящих в состав так называемого целлюлазного комплекса [2].

Микроорганизмы, способные разлагать целлюлозу, продуцируют набор ферментов с различными специфичностями, работающие в синергизме. Целлюлазы гидролизуют β -1,4-гликозидные связи целлюлозы. Традиционно они делятся на два класса, упоминаемые как эндоглюканазы и целлобиогидролазы. Эндоглюканазы (эндо-1,4- β -глюканазы, эндо- β -1,4-D-глюкан-4-глюканогидролазы, EGs, EC 3.2.1.4) могут гидролизовать внутренние связи (предпочтительно в аморфных областях целлюлозы), освобождая новые терминальные концы. Целлобиогидролазы (экзоглюканазы, экзо-1,4- β -D-глюканазы, СВНs, EC 3.2.1.91) действуют на существующие или образованные эндоглюканазой концы цепи. Оба фермента могут деградировать аморфную целлюлозу, но, за некоторыми исключениями, СВНs являются единственными ферментами, которые эффективно разлагают кристаллическую целлюлозу. СВНs и EGs высвобождают молекулы целлобиозы. Для эффективного гидролиза целлюлозы также требуются β -глюкозидазы (β -D-глюкозид глюкангидролазы, EC 3.2.1.21), которые гидролизуют целлобиозу, высвобождая две молекулы глюкозы [5].

Таким образом, под термином «целлюлазы» понимается группа ферментов, которые в совокупности обладают способностью катализировать гидролиз цел-

© 2021 г. Шубаков А.А., Володина С.О., Мартынов В.В., Шергина Н.Н., Володин В.В.

* Автор для переписки:

Шубаков Анатолий Александрович

старший научный сотрудник, канд. биол. наук, Институт биологии ФИЦ Коми научный центр УрО РАН

E-mail: shubakov.anatol@mail.ru

люлозы до глюкозы. Полученная глюкоза затем может быть использована в качестве субстрата для получения многих продуктов брожения, включая этанол в качестве биотоплива второго поколения. При переходе к промышленному получению целлюлаз остается нерешенной проблема повышения выхода ферментов и сбалансированности их состава для более полного расщепления целлюлозы до глюкозы, которая напрямую связана с повышением экономической эффективности процесса ферментативного гидролиза целлюлозы. Для решения указанной проблемы в настоящее время проводятся исследования по повышению выхода ферментов при культивировании известных продуцентов целлюлаз с помощью физиолого-биохимических подходов, а также проводится поиск новых продуцентов среди бактерий и актиномицетов. В тех странах, в которых налажено промышленное получение целлюлаз, в основном используются штаммы низших грибов, например, рода *Trichoderma*, которые характеризуются более сбалансированным составом целлюлаз для деструкции целлюлозы.

В 1980–1990-е годы в СССР проводились активные работы по получению мутантных штаммов гриба *Trichoderma viride* с высокой целлюлолитической активностью [5]. Наиболее активные штаммы *Trichoderma viride* 44 и 13/10 были переданы на хранение в центральный музей микроорганизмов ВНИИгенетика под регистрационными номерами F-105 и F-120.

В доперестроечный период в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН совместно с ВНИИгенетика и Институтом биохимии им. А.Н. Баха АН СССР были проведены многолетние исследования по регуляции синтеза внеклеточных целлюлаз в культуре *Trichoderma viride* обоих штаммов и получению глюкозных сиропов ферментативным гидролизом мелкого волокна, отхода бумагоделательных машин Сыктывкарского лесопромышленного комплекса (ЛПК), в результате чего была создана комплексная малоотходная технология биоконверсии целлюлозы в глюкозу [1, 4]. В связи с ростом интереса международного научного сообщества к использованию ферментативных технологий для превращения лигноцеллюлозной биомассы в сбраживаемые сахара как ключевой стадии получения биотоплива второго поколения, в последние годы нами были возобновлены исследования по получению высокоактивных ферментных препаратов целлюлаз и целлюлозного этанола с использованием лигноцеллюлозных древесных отходов, утилизация которых в Республике Коми представляет собой актуальную проблему.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании особенностей продуцирования целлюлаз культурами двух промышленных штаммов *Trichoderma viride*, 44 и 13/10 в процессе их глубинного культивирования в среде Чапека после длительного, 25-летнего хранения в научной коллекции.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись два штамма мицелиального гриба *Trichoderma viride* 44 и 13/10. Культуры грибов поддерживали в течение 30 лет на скошенном сусло-агаре при температуре +4 °С. Длительные пересевы грибов проводились примерно через каждые 3–6 месяцев.

Для получения посевного материала использовали по 10 мл споровых суспензий *Trichoderma viride* 44 и *T. viride* 13/10 в стерильной дистиллированной воде, полученные путем смыва со скошенного сусло-агара. Посевной материал получали путем глубинного культивирования грибов в колбах Эрленмейера с рабочим объемом среды Чапека 100 мл при перемешивании (120 об/мин) и комнатной температуре. Состав среды Чапека (г/л): NaNO_3 – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01. В качестве посевного материала использовали 4-суточную культуру штамма 44 и 8-суточную культуру штамма 13/10, выращенные в среде Чапека с 3% глюкозы.

Засев опытных колб проводили в расчете 10 мл посевного материала на 100 мл среды. Культуры выращивали в колбах Эрленмейера с объемом питательной среды 100 или 200 мл при комнатной температуре при перемешивании с использованием шейкера S 3.02 10/20 М при 120 об/мин. Для исследования особенностей продуцирования целлюлаз грибы культивировали в среде Чапека в течение 14 суток. В качестве источников углерода использовали лактозу (3%), микрокристаллическую целлюлозу (1% МКЦ), глюкозу (3%). Исходное значение рН среды было 5,0 без дальнейшего регулирования.

Общую целлюлазную активность по осаживанию фильтровальной бумаги (АФБ) определяли по методу Родионовой с соавт. [3]. Полоски бумаги Ватман № 1 размером 1×6 см помещали в 2 стеклянные пробирки, в которые добавляли 1 мл 0,05 М натрий-ацетатного буфера (рН=5,0) и 1 мл соответствующе разбавленного ферментного раствора (культуральной жидкости). Пробирки инкубировали в водяном термостате при 50 °С в течение 1 часа, после чего из каждой пробирки отбирали по 1 мл раствора и определяли в них редуцирующие сахара по методу Шомоди – Нельсона

[10, 12]. Калибровочный график строили по D-глюкозе. За одну единицу АФБ принимали такое количество фермента, которое освобождает при данных условиях из фильтровальной бумаги 1 мкмоль эквивалентов глюкозы за 1 час. АФБ выражается числом указанных единиц в 1 мл раствора фермента (культуральной жидкости).

Карбоксиметилцеллюлазную активность (КМЦ-аза) определяли по накоплению редуцирующих сахаров после 10 мин инкубации 1 мл водного раствора фермента (культуральной жидкости) при 50 °С с 1 мл 1%-ного раствора натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) в 0,05 М натрий-ацетатном буфере (рН=5,0). После этого из каждой пробирки отбирали по 1 мл раствора и определяли в них образовавшиеся редуцирующие сахара по методу Шомоди — Нельсона. Калибровочный график строили по D-глюкозе. За единицу активности КМЦ-азы принимали такое количество фермента, которое освобождает из Na-КМЦ при данных условиях 1 мкмоль эквивалентов глюкозы за 1 час. КМЦ-азная активность выражается числом указанных единиц в 1 мл раствора фермента (культуральной жидкости).

Удельную активность ферментов рассчитывали как отношение активности фермента (ед./мл) к концентрации белка в растворе (мг/мл), определенной по методу Лоури [8]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. Удельную активность ферментов также рассчитывали как отношение активности фермента (ед./мл) к весу сухой биомассы грибной культуры (мг/мл).

Рост культуры контролировали по весу сухой биомассы. Биомассу грибов определяли весовым методом путем фильтрования проб культуральных бульонов двух штаммов *T. viride* через бумажные фильтры на воронке Бюхнера и высушивания фильтров с биомассой при 60 °С до постоянного веса. Из-за технических трудностей не была определена удельная АФБ и КМЦ-азная активность по сухой биомассе при выращивании культуры на среде с МКЦ в виду невозможности отделения биомассы от непрореагировавшей МКЦ.

При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение с использованием компьютерных программ «Биостат» (версия 4.03) и Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Продуцирование целлюлазы (АФБ) мицелиальным грибом *Trichoderma viride*. Проведен 14-суточный эксперимент по глубинному культивированию двух штаммов мицелиального гриба *Trichoderma viride*: ВКПМ F-44 и ВКПМ F-13/10, для сравнительного изучения продуцирования ими ферментов целлюлаз.

В процессе культивирования в колбах двух штаммов *T. viride* в среде Чапека с разными источниками углерода (3%-ная лактоза, 1%-ная МКЦ, 3%-ная глюкоза) были отобраны пробы культуральных бульонов для определения веса сухой биомассы гриба и анализа культуральной жидкости на общую целлюлазную активность по осахариванию фильтровальной бумаги (АФБ) — на нерастворимой целлюлозе (фильтровальная бумага) и на карбоксиметилцеллюлазную активность (КМЦ-аза) — на растворимой целлюлозе (КМЦ), а также на содержание белка по Лоури.

С помощью фильтрования через бумажные фильтры на воронке Бюхнера проб культуральных бульонов двух штаммов *T. viride* (исходные, 3, 4, 6, 7, 10, 14 суток роста) получены культуральные жидкости и определена сухая биомасса гриба в процессе роста. В полученных культуральных жидкостях определены АФБ, КМЦ-азная активность и содержание белка.

На рисунке 1 представлена динамика роста штаммов *T. viride* 44 и 13/10 в среде Чапека с 3%-ной лактозой и с 3%-ной глюкозой.

Как видно из рисунка 1, наиболее активным ростом, по сравнению со штаммом 44, обладает штамм 13/10. Сухая биомасса штамма 13/10 при росте на глюкозе и лактозе достигает 7,7–12,0 г/л, у штамма 44 — 6,8–7,1 г/л. Период активного, экспоненциального роста обоих штаммов заканчивается через 6 суток культивирования, и обе культуры плавно переходят в стационарную фазу роста.

Штамм 13/10 продуцирует больше целлюлаз по сравнению со штаммом 44. АФБ штамма 13/10 при росте на лактозе достигает 1,9–2,3 ед./мл, при росте на МКЦ — 0,14–0,17 ед./мл (рис. 2).

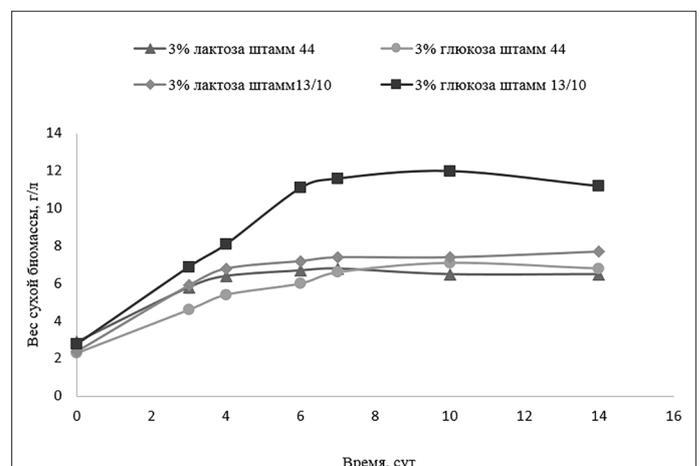


Рис. 1. Динамика роста (г/л) штаммов *Trichoderma viride* 44 и 13/10 при культивировании в среде Чапека с 3%-ной лактозой и с 3%-ной глюкозой

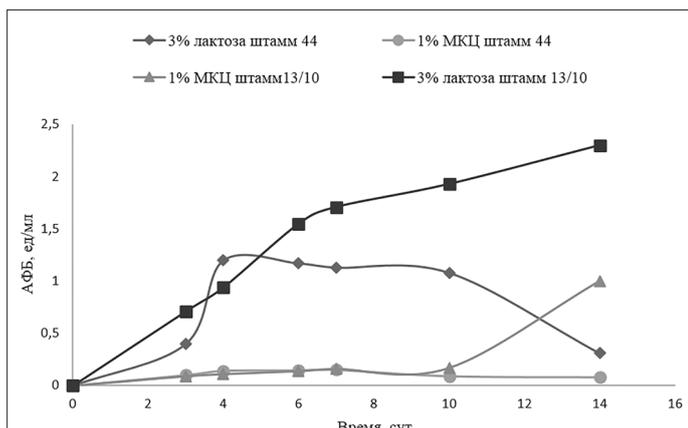


Рис. 2. АФБ (ед/мл) штаммов *Trichoderma viride* 44 и 13/10 при культивировании в среде Чапека с 3%-ной лактозой и с 1%-ной МКЦ

Удельная АФБ по белку при росте на 1% МКЦ у обоих штаммов по сравнению с ростом на 3%-ной лактозе существенно ниже.

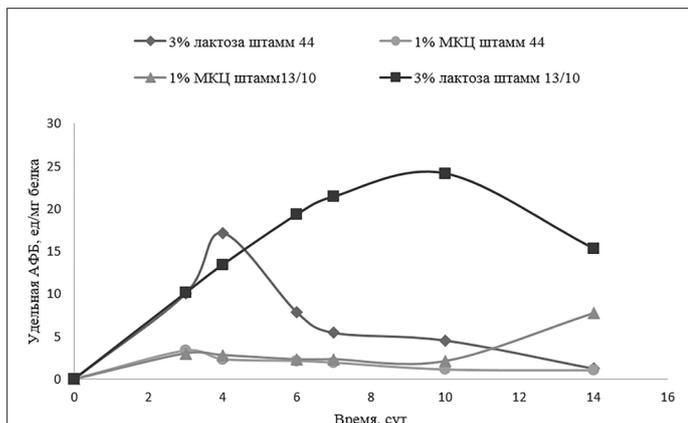


Рис. 3. Удельная АФБ (ед/мг белка) штаммов *Trichoderma viride* 44 и 13/10 при культивировании в среде Чапека с 3%-ной лактозой и с 1%-ной МКЦ

Как видно из рисунка 3, наибольшей удельной АФБ по белку обладает штамм 13/10 при росте на 3%-ной лактозе — 24,1 ед/мг белка через 10 суток роста. У штамма 44 при росте на 3%-ной лактозе через 4 суток роста удельная АФБ по белку немного ниже и составляет 17,1 ед/мг белка, и далее в процессе роста она снижается до 1,2 ед/мг белка.

Наибольшей удельной АФБ по биомассе при росте на 3%-ной лактозе обладает штамм 13/10, при этом данная активность в процессе роста культуры плавно нарастает и к 14 суткам культивирования достигает 0,3 ед/мг с.б. (рис. 4). Удельная АФБ по сухой биомассе при росте на МКЦ не определялась по причине, изложенной выше в экспериментальной части.

Напротив, у штамма 44 наибольшая удельная АФБ по биомассе наблюдается к 4-м суткам роста — 0,19 ед/мг с.б., далее снижается и в конце опыта составляет 0,05 ед/мг с.б.

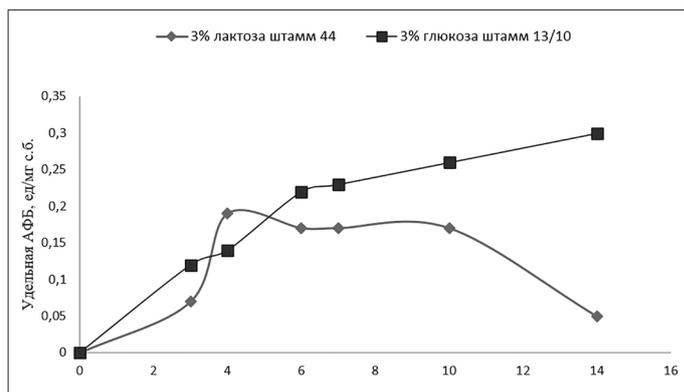


Рис. 4. Удельная АФБ (ед/мг с.б.) штаммов *Trichoderma viride* 44 и 13/10 при культивировании в среде Чапека с 3%-ной лактозой

Продуцирование карбоксиметилцеллюлазы (КМЦ-аза) мицелиальным грибом *Trichoderma viride*. Была определена способность штаммов *T. viride* 44 и 13/10 продуцировать КМЦ-азы (карбоксиметилцеллюлазы) — ферменты, катализирующие гидролиз растворимой формы целлюлозы — натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ). Для этого обе культуры выращивали в среде Чапека, содержащей в качестве источника углерода и индуктора биосинтеза целлюлаз 3%-ную лактозу и 1%-ную МКЦ.

На рисунке 5 представлены данные по образованию КМЦ-азы штаммами *T. viride* 44 и 13/10 при росте на 3% лактозе и 1% МКЦ.

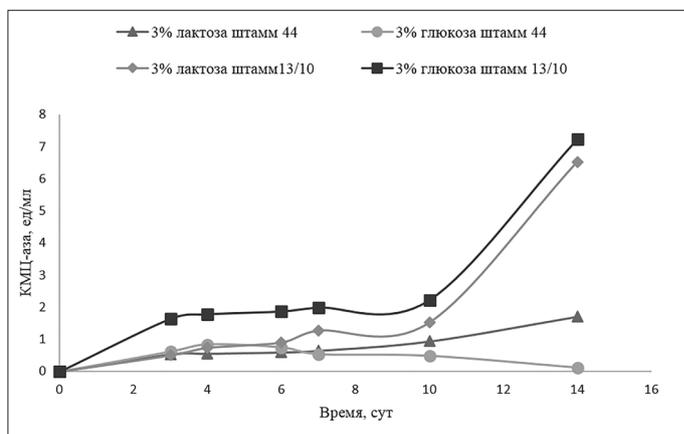


Рис. 5. КМЦ-азная активность (ед/мл) штаммов *Trichoderma viride* 44 и 13/10 при культивировании в среде Чапека с 3%-ной лактозой и с 1%-ной МКЦ

В процессе роста штаммов количество КМЦ-азы увеличивается и наибольшая активность фермента обнаруживается у штамма 13/10 как на 3%-ной лактозе (7,2 ед/мл через 14 суток), так и на 1%-ной МКЦ (6,5 ед/мл через 14 суток). КМЦ-азная активность штамма 44 при росте на обоих источниках углерода существенно ниже и не превышает 1,7 ед/мл при росте на 3%-ной лактозе.

Аналогичные закономерности сохраняются у обоих штаммов как в отношении удельной активности КМЦ-азы по белку (рис. 6), так и в отношении удельной активности КМЦ-азы по сухой биомассе (рис. 7).

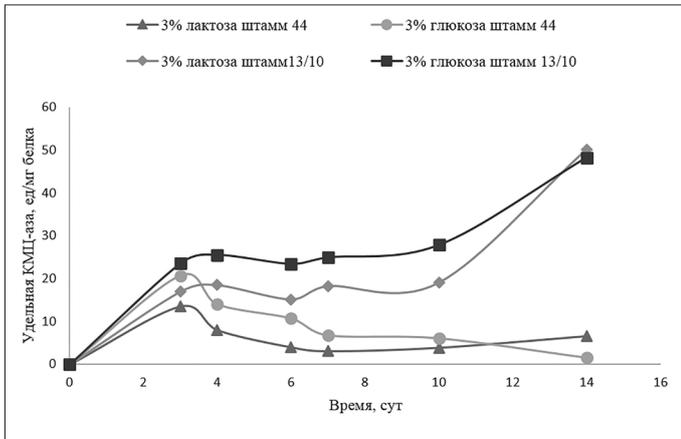


Рис. 6. Удельная КМЦ-азная активность по белку (ед./мг белка) штаммов *Trichoderma viride* 44 и 13/10 при культивировании в среде Чапека с 3%-ной лактозой и с 1%-ной МКЦ

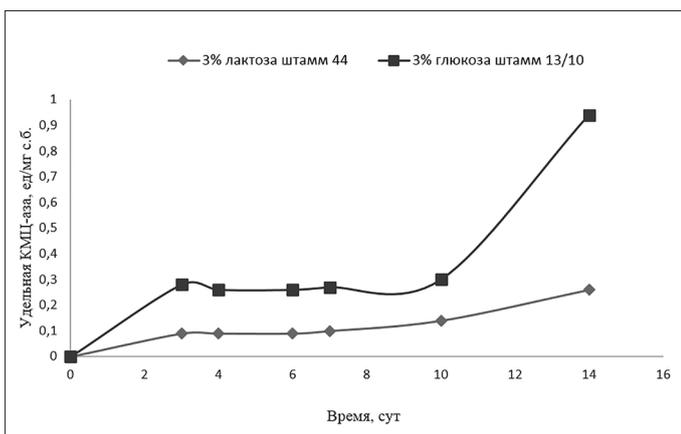


Рис. 7. Удельная КМЦ-азная активность по биомассе (ед./мг с.б.) штаммов *Trichoderma viride* 44 и 13/10 при культивировании в среде Чапека с 3%-ной лактозой

Как видно из рисунка 6, удельная КМЦ-азная активность по белку штамма 13/10 в процессе культивирования увеличивается и к 14 суткам роста достигает 50,2 ед./мг белка (на 1%-ной МКЦ) и 48,3 ед./мг белка (на 3%-ной лактозе). Удельная КМЦ-азная активность штамма 44 ниже и к 4-м суткам роста она максимальная — 20,7 ед./мг белка (на 1%-ной МКЦ) и 13,5 ед./мг белка (на 3%-ной лактозе).

Что касается удельной активности КМЦ-азы по биомассе (см. рис. 7), то наибольший ее уровень определяется у штамма 13/10 — 0,94 ед./мг с.б. через 14 суток роста.

Удельная активность КМЦ-азы по биомассе штамма 44 при росте на лактозе в три раза ниже и к 14 суткам роста составляет 0,26 ед./мг с.б. Удельная активность КМЦ-азы по биомассе при росте на МКЦ не определялась по причине, изложенной выше в экспериментальной части.

Заключение

Известно, что синтез грибных целлюлаз регулируется как индукцией, так и репрессией конечным продуктом — глюкозой [7, 9]. Целлюлолитическая активность грибов может варьировать в зависимости от среды, а также от условий культивирования. Следовательно, выбор подходящих стратегий ферментации является ключевым фактором для принятия решения об эффективности гриба с точки зрения продукции целлюлазы [11]. Продукцию целлюлазы можно положительно регулировать, используя целлюлозу в составе среды, в то время как целлюлаза отрицательно регулируется глюкозой и целлобиозой [6].

Ранее в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН была показана возможность использования непровара (сучковой целлюлозы — трудно расщепляемого побочного продукта бумажного производства) и лигнифицированного остатка после ферментативного гидролиза целлюлозы в качестве эффективных индукторов биосинтеза целлюлаз. Доступность целлюлозы и ее деструкция под действием ферментов в этих субстратах затруднена, поэтому в среде значительно понижен стационарный уровень продукта гидролиза — глюкозы, являющейся катаболическим репрессором. Предложенный способ позволяет повысить выход целлюлаз в 1,5–4 раза, при этом заменить субстрат свеколочный жом, имеющий кормовое значение, дешевыми отходами бумажного производства (непровар) или непрогидролизованными остатками лигноцеллюлозы после ферментативного гидролиза [1]. Использование отходов после ферментативного гидролиза целлюлозы в качестве источника углерода и индуктора биосинтеза целлюлаз позволяет, кроме того, вовлечь этот отход в производство и сделать технологию биоконверсии целлюлозы малоотходной.

Нами исследованы особенности продуцирования целлюлаз культурами двух промышленных штаммов *T. viride* 44 и 13/10 в процессе их глубинного культивирования на среде Чапека после длительного (25 лет) хранения штаммов в коллекции. Установлено, что наиболее активным ростом в среде Чапека с лактозой и с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ) в качестве индукторов обладает штамм 13/10. Штамм 13/10 продуцирует больше целлюлаз по сравнению со штаммом 44. При росте на 3%-ной лактозе

и на 1%-ной МКЦ общая целлюлазная активность по осахариванию фильтровальной бумаги (АФБ) штамма 13/10 составляет соответственно 1,9–2,3 ед/мл и 0,14–0,17 ед/мл. Ниже уровень АФБ у штамма 44. В процессе роста штаммов карбоксиметилцеллюлазная активность (КМЦ-аза) увеличивается и наибольшая активность фермента обнаруживается у штамма 13/10 как на 3%-ной лактозе (7,2 ед/мл), так и на 1%-ной МКЦ (6,5 ед/мл). КМЦ-азная активность штамма 44 при росте на обоих источниках углерода существенно ниже и не превышает 1,7 ед/мл при росте на 3%-ной лактозе.

Таким образом, активности ферментов целлюлазного комплекса двух исследованных штаммов после длительного хранения в коллекции снизились по сравнению с активностями у исходных штаммов. Поскольку условия, при которых были определены активности ферментов у изучаемых штаммов *T. viride* до и после их длительного хранения в коллекции, отличались, не представляется возможным сравнить абсолютные значения этих величин. Однако можно сделать заключение, что штамм 13/10 может быть рекомендован для использования в сельском хозяйстве для осахаривания соломы и других сельскохозяйственных отходов, а также найти применение в промышленной биотехнологии для получения целлюлаз для ферментативного гидролиза целлюлозы с целью получения сахаров и биотоплива.

Исследования выполнены по теме НИР Института биологии ФИЦ Коми научного центра УрО РАН № гос. регистрации АААА-А17-117121270025-1.

Литература

1. Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья (Тр. Коми научного центра УрО Российской академии наук. № 125) / Ред. В.В. Володин. — Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 1992. — 73 с.
2. Клесов А.А., Григораш С.Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы III. Закономерности образования глюкозы и целлобиозы при действии полиферментных целлюлазных систем на нерастворимую (природную) целлюлозу // Биоорганическая химия. — 1981. — Т. 7. — № 10. — С. 1538–1552.
3. Родионова Н.А., Тиунова Н.А., Фениксова Р.В. Методы определения целлюлазной активности // Прикл. биохим. микробиол. — 1966. — Т. 2. — Вып. 2. — С. 197–205.
4. Способ получения целлюлаз: а.с. 1491886 СССР / Е.С. Морозова, Л.И. Сажина (Алексеева), М.Л. Рабинович, А.С. Селиванов, А.М. Морозов, Т.И. Ширшова, А.А. Клесов, М.Л. Яковлева, Н.Н. Смертин; Институт биохимии им. А.Н. Баха и Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микро-

- организмов. — № 4271847/31-13; заявл. 30.06.1987; опубл. 27.07.1989. Бюл. № 25.
5. Штамм *Trichoderma viride* ВНИИгенетика 13/10, продуцирующий целлюлитические ферменты : а.с. 923188 СССР / Е.С. Морозова, Н.Н. Чапнина, В.И. Гребеньков, М.Л. Яковлева; Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов. — № 3216437/15; заявл. 16.12.1994; опубл. 30.01.1994.
6. Ali N., Athar M.A., Khan Y.H., Idrees M., Ahmad D. Regulation and improvement of cellulase production: Recent Advances // Nat. Res. — 2014. — Vol. 5. — P. 857–863.
7. Lo C.-M., Zhang Q., Callow N.V., Ju L.-K. Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction // Bioresour. Technol. — 2010. — Vol. 101. — No. 2. — P. 717–723.
8. Lowry O.H., Roserbrough N.J., Fan A.L., Randall R.J. New method of determination proteins // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
9. Mandels M., Reese E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals // J. Bacteriol. — 1957. — Vol. 73. — No. 2. — P. 269–278.
10. Nelson N. A photometric adaptation of the determination of reducing sugars // J. Biol. Chem. — 1944. — Vol. 153. — P. 375–380.
11. Sajth S., Priji P., Sreedevi S., Behjamin S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective // J. Nutr. Food Sci. — 2016. — Vol. 6. — No. 1. — P. 1–13.
12. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars // J. Biol. Chem. — 1945. — Vol. 160. — P. 61–68.

References

1. Biokonversiya tsellyulozoderzhashchego syr'ya (Tr Komi nauchnogo tsentra UrO Rossiyskoy akademii nauk. № 125). Red VV Volodin. Syktyvkar: Komi NTS UrO RAN, 1992: 73 (in Russian).
2. Klesov AA, Grigorash SYu. Fermentativnyy gidroliz tsellyulozy III. Zakonomernosti obrazovaniya glyukozy i tsellobiozy pri deystvii polifermentnykh tsellyulaznykh sistem na nerastvorimuyu (prirodnuyu) tsellyulozu. Bioorganicheskaya khimiya 1981; 7(10):1538–1552 (in Russian).
3. Rodionova NA, Tiunova NA, Feniksova RV. Metody opredeleniya tsellyulaznoy aktivnosti. Prikl biokhim mikrobiol 1966; 2(2):197–205 (in Russian).
4. Sposob polucheniya tsellyulaz: a.s. 1491886 SSSR / YeS Morozova, LI Sazhina (Aleksyeva), ML Rabinovich, AS Selivanov, AM Morozov, TI Shirshova, AA Klesov, ML Yakovleva, NN Smertin; Institut biokhimii im AN Bakha i Vsesoyuznyy nauchno-issledovatel'skiy institut genetiki i selektsii promyshlennykh mikroorganizmov. № 4271847/31-13; zayavl 30.06.1987; opubl 27.07.1989. Byul № 25 (in Russian).

5. Shtamm *Trichoderma viride* VNIIGenetika 13/10, produtsiruyushchiy tselyuloliticheskiye fermenty : a.s. 923188 SSSR / YeS Morozova, NN Chapnina, VI Greben'kov, ML Yakovleva; Vsesoyuznyy nauchno-issledovatel'skiy institut genetiki i selektsii promyshlennykh mikroorganizmov. № 3216437/15; zayavl 16.12.1994; opubl 30.01.1994 (in Russian).
6. Ali N, Athar MA, Khan YH, Idrees M, Ahmad D. Regulation and improvement of cellulase production: Recent Advances. *Nat Res* 2014; 5:857–863.
7. Lo C-M, Zhang Q, Callow NV, Ju L-K. Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. *Bioresour. Technol* 2010; 101(2):717–723.
8. Lowry OH, Roserbrough NJ, Fan AL, Randall RJ. New method of determination proteins. *J Biol Chem* 1951; 193:265–275.
9. Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J Bacteriol* 1957; 73(2):269–278.
10. Nelson N. A photometric adaptation of the determination of reducing sugars. *J Biol Chem* 1944; 153:375–380.
11. Sajth S, Priji P, Sreedevi S, Behjamin S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J Nutr Food Sci* 2016; 6(1):1–13.
12. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars. *J Biol Chem* 1945; 160:61–68.

COMPARATIVE STUDY OF CELLULASE ACTIVITY OF TWO PRODUCTION STRAINS OF *TRICHODERMA VIRIDE* AFTER LONG-TERM STORAGE IN COLLECTION

A.A. SHUBAKOV¹, S.O. VOLODINA¹, V.V. MARTYNOV¹,
N.N. SHERGINA^{1,2}, V.V. VOLODIN¹

¹*Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch RAS,*
²*Pitirim Sorokin Syktyvkar State University, Syktyvkar*

The features of cellulase production by *Trichoderma viride* ARCIM F-44 and ARCIM F-13/10 cultures during their submerged cultivation on Czapek's medium after long-term (25 years) storage of strains in the collection were studied. It was shown that the most active growth in Czapek's medium with lactose and microcrystalline cellulose (MCC) is in the strain 13/10. Strain 13/10 produces more cellulases as compared to strain 44. With growth on 3% lactose and 1% MCC, the total cellulase activity for saccharification of filter paper (SFP) of strain 13/10 is 1,9-2,3 U/ml and 0,14–0,17 U/ml, respectively. The level of SFP is lower in strain 44. During the growth of strains, carboxymethylcellulase activity (CMC-ase) increases and the highest activity of the enzyme is found in strain 13/10 both at 3% lactose (7,2 U/ml) and at 1% MCC (6,5 U/ml). The CMC-ase activity of strain 44 during growth on both carbon sources is significantly lower and does not exceed 1,7 U/ml with growth on 3% lactose.

Keywords: filamentous fungi, *Trichoderma viride*, strains, cultivation, production of cellulases, cellulase activity, saccharification activity of filter paper, carboxymethylcellulase activity.

Address:

Shubakov A.A., Ph.D.
Senior Researcher, Institute of Biology, Federal Research Center,
Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
E-mail: shubakov.anatol@mail.ru

Для цитирования:

Шубаков А.А., Володина С.О., Мартынов В.В., Шергина Н.Н., Володин В.В. Продуцирование целлюлаз аскомицетным грибом *Trichoderma viride* после длительного хранения в коллекции. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(4):48–54.

For citation:

Shubakov A.A., Volodina S.O., Martynov V.V., Shergina N.N., Volodin V.V. Comparative study of cellulase activity of two production strains of *Trichoderma viride* after long-term storage in collection. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(4):48–54 (in Russian).

ТВЕРДЫЕ ФОРМЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

А.В. КОМИССАРОВ^{1*}, М.В. ОВЧИННИКОВА¹, Д.Н. БИБИКОВ¹, Н.В. СИНИЦЫНА¹,
Е.А. ГЛАЗКОВА¹, К.С. ГУМАЮНОВА¹, О.С. ЗИНИНА¹, А.К. НИКИФОРОВ^{1,2}

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,

²Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов

Представлен обзор отечественной литературы, посвященный вопросам получения твердых форм лекарственных бактериофагов. Проанализированы сведения Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) в Российской Федерации, (по состоянию на середину 2021 г.) о зарегистрированных препаратах с группировочным (химическим) наименованием — «бактериофаг в твердой лекарственной форме», — и дана их характеристика. Рассмотрены данные о качественном и количественном составе вспомогательных веществ, используемых при высушивании, получении таблеток и капсул. На ряде примеров показано влияние технологических параметров процессов получения твердых форм лекарственных бактериофагов на качество препаратов. Подтверждено, что получение лекарственных бактериофагов в твердой форме минимизирует воздействие на них кислой среды желудка. Осуществленное изучение информации научной и патентной периодики дает возможность принять во внимание воздействие изложенных в статье факторов при создании технологии изготовления лечебных бактериофагов.

Ключевые слова: лекарственные бактериофаги, лиофилизация, вспомогательные вещества, таблетки, капсулы.

Введение

Первые упоминания о применении бактериофагов как лечебных препаратов относятся к двадцатым годам прошлого века, когда французский микробиолог Ф. д'Эрелль впервые применил бактериофаги для лечения бубонной чумы в Египте [5].

В нашей стране бактериофаги были впервые массово использованы в экстренных ситуациях, вызванных вспышками бактериальных инфекций в конце 1930-х годов. В 1938 г. в нескольких районах Афганистана, граничащих с территорией СССР, разразилась эпидемия холеры. Чтобы предупредить распространение этого тяжелейшего бактериального заболевания, было решено использовать на пограничных территориях холерный бактериофаг. Фаговый препарат давали местному населению, добавляли в колодцы и водоемы. В итоге на советской территории не было зарегистрировано ни одного случая заболевания холерой [21].

В ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с 1993 по 2003 гг. производился лечебный стафилококковый бактериофаг в виде раствора для приема внутрь. На данный момент выпускаются только диагностические чумные, холерные и псевдотуберкулезный бактериофаги в форме лиофилизата. Между тем все возрастающий интерес к замене антибиотикотерапии фаготерапией, а также существующие технологические мощности для организации производства лечебных бактериофагов дали нам основания обобщить отечественный опыт приготовления твердых форм лекарственных бактериофагов.

Анализ отечественного опыта приготовления твердых форм лекарственных бактериофагов

Первое упоминание о получении бактериофагов в твердой лекарственной форме, согласно имеющимся у нас данным, относится к середине 1940-х годов и описан в авторском свидетельстве СССР 64612 [23]. Согласно ему, фаголизат стерилизуют со средой выращивания при 40 °С в атмосфере хлороформа, смешивают с нормальной лошадиной сывороткой и карамелизированным крахмалом, смесь высушивают при 37–40 °С и таблетуют.

В России и странах СНГ препараты бактериофагов применяют для профилактики и лечения: инфекционных поражений желудочно-кишечного тракта (дизентерия, брюшной тиф, сальмонеллез, дисбактериоз и др.);

© 2021 г. Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Бибииков Д.Н., Сеницына Н.В., Глазкова Е.А., Гумаюнова К.С., Зинина О.С., Никифоров А.К.

* **Автор для переписки:**

Комиссаров Александр Владимирович

докт. биол. наук, профессор, главный научный сотрудник ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

E-mail: Komissarov-9@yandex.ru

гнойно-воспалительных заболеваний глаз, ушей, носа, ротовой полости, горла, легких (отит, ангина, фарингит, стоматит, пародонтит, конъюнктивит, гайморит, фронтит, пневмония и др.); хирургических инфекций (обработка послеоперационных и гноящихся ран, гнойные поражения кожи, перитонит и др.); ожоговых ран; урогенитальных инфекций (цистит, пиелонефрит, вульвит и др.) и других заболеваний [17].

Традиционной формой выпуска бактериофагов является жидкий препарат (кроме таблетированных форм кишечных фагов), поэтому фаги используют для приема через рот, в виде клизм, аппликаций, орошений, введения в полости ран, вагины, матки, носа, а также путем введения в дренированные полости — брюшную, плевральную, мочевого пузыря, почечной лоханки. Однако, поскольку при приеме жидких препаратов через рот происходит частичная инактивация бактериофагов кислой средой желудка, целесообразно выпускать препараты бактериофагов в таблетках и суппозиториях [17].

Следует сказать о том, что, по данным ГРЛС, твердые лекарственные формы производятся только в виде таблеток и представлены двумя наименованиями:

1. Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE является таблеткой с кислотоустойчивым покрытием и представляет собой биофармацевтическую композицию следующего состава (на 1 таблетку). Действующее вещество: лиофилизированные очищенные бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении бактерий рода *Salmonella* (с активностью по Аппельману) гр. А — *S. paratyphi A*, гр. В — *S. paratyphi B*; *S. heidelberg*; гр. С — *S. newport*; *S. choleraesuis*, *S. oranienburg*, *S. infantis*; гр. D — *S. dublin*, *S. enteritidis*; гр. E — *S. anatum*, *S. newlands* — не менее 10^3 ; гр. В — *S. typhimurium* не менее 10^4 — 6,3 мг. Вспомогательные вещества: кальция глюконат — 56,3 мг, декстрозы моногидрат — 5,8 мг, пектин — 5,0 мг, лактозы моногидрат — 11,2 мг, молоко обезжиренное (сухой остаток) — 11,4 мг, тальк — 3,0 мг, кальция стеарат — 1,0 мг.

2. Бактериофаг дизентерийный поливалентный является таблеткой с кислотоустойчивым покрытием и представляет собой биофармацевтическую композицию следующего состава (на 1 таблетку). Действующее вещество: лиофилизированные очищенные бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении бактерий рода *Shigella* (с активностью по Аппельману) *S. flexneri* 1, 2, 3, 4 серотипов — не менее 10^7 , *S. flexneri* 6 серотипа — не менее 10^4 ; *S. sonnei* — не менее 10^6 — 6,3 мг. Качественно-количественный состав вспомога-

тельных веществ аналогичен бактериофагу сальмонеллезному групп ABCDE.

Ряд аспектов производства таблетированных бактериофагов раскрыт в научной периодике и патентных документах. Так, еще в 1965 г. специалистами Тбилисского НИИ вакцин и сывороток запатентован способ получения сухого бактериофага [18]. В реакторах из нержавеющей стали готовили поливалентный фаголизат из дизентерийных микробов основных видов и соответствующего фага. После добавления консерванта хинозола до концентрации 0,01% нативный дизентерийный бактериофаг фильтровали и заливали в реактор осаждения, в который добавляли сульфат аммония до полного насыщения раствора. После тщательного перемешивания доводили рН среды до значения 6,9–7,0 и выдерживали при температуре 2–10 °С в течение 10 ч. Образовавшийся осадок концентрированного фага отделяли фильтрованием через миткалевое полотно. Из 1 л жидкого фага получали 10 г сырой массы, к которой добавляли стабилизатор (глюконат кальция в количестве 9% от основного вещества), тщательно растирали, наносили тонким слоем на кюветы или лотки, замораживали и лиофильно высушивали в течение 24 ч. Для лучшего снятия массы с кювет внутреннюю поверхность последних рекомендовали смачивать 1%-ным раствором стеарина в эфире. Перед таблетированием сухой порошок бактериофага просеивали через сито и добавляли к нему таблеточный наполнитель (глюкоза, глюконат кальция, тальк и стеарин).

Имеются сведения о производимом ранее бактериофаге брюшнотифозном, представляющем собой фильтрат фаголизата сальмонелл брюшного тифа в таблетках, покрытых оболочкой. Консервант хинозол в концентрации 0,06 мг/мл, стабилизаторы — кальция глюконат и молоко сгущенное обезжиренное; наполнители — тальк, глюкоза и кальция стеарат [3]. Также имеются сведения об желудочно-резистентных таблеточных составах бактериофагов без оболочки с пектином [20]. Однако, по утверждению исследователей [10], они пригодны только для стабильных видов бактериофагов (брюшнотифозный, дизентерийный) и не обеспечивают стабильность компонентов ряда бактериофагов из-за кислой среды пектина.

В Уфимском НИИ вакцин и сывороток разработана технология производства лечебно-профилактических препаратов очищенного концентрированного стафилококкового бактериофага [19]. Полуфабрикаты стафилококкового бактериофага, полученные после реакторного культивирования были очищены и сконцентрированы методом ионообменной хроматографии

на ДЭАЭ-целлюлозе и баромембранными методами. С целью сохранения литической активности концентратов фага в процессе лиофилизации, таблетирования и хранения были изучены способы их стабилизации различными средами и стабилизаторами (средой Файбича, гущеным обезжиренным стерилизованным молоком, сухим обезжиренным стерилизованным молоком). Для получения сухих препаратов фага проводили лиофилизацию концентратов с литической активностью 10^{10} на сублимационной сушильной установке ТГ-15-6. В этих целях очищенный стерильный концентрат фага со стабилизатором помещали в кассеты по 0,5 л. Затем сырую массу замораживали при минус $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 18 ± 2 ч. Замороженную массу высушивали в течение 42 ± 2 ч. Лучшую сохраняемость литической активности фага, как при лиофилизации, отмечали при использовании в качестве стабилизатора сухого обезжиренного молока. Высушенные концентраты фагов таблетировали, используя традиционные наполнители. Таблетирование осуществляли прессованием на таблеточной машине роторного типа. Вес таблеток составлял 0,1 и 0,2 г. Таблетки покрывали кислотоустойчивой оболочкой из ацетилфталилцеллюлозы. Препарат фасовали в 20 мл флаконы по 50 или 100 таблеток или в блистерную упаковку по 50 шт. Лучшей сохраняемостью литической активности при длительном хранении обладала сухая форма препарата фага, полученная после концентрирования фага на ДЭАЭ-целлюлозе. Препараты обладали высокой литической активностью и были стабильны при длительном хранении (в течение 1 года).

В научной литературе имеется довольно большое количество работ, посвященных разработке бактериофагов, выполненных в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского. Однако, что касается технологии твердых лекарственных форм, мы нашли упоминание о них всего в 2 патентах на изобретение [1, 24]. При этом в описании данных документов, к сожалению, нет информации, представляющей интерес для целей монографии.

Большой цикл работ по получению твердых лекарственных форм бактериофагов представлен работами специалистов Пермской государственной фармацевтической академии и Пермского НПО «Биомед».

В патенте РФ 2241446 [22] раскрыта фармацевтическая композиция таблеток с кислотоустойчивым покрытием, содержащая бактериофаги с наполнителем в виде дозированных лекарственных форм и дополнительно содержащая водорастворимые полимеры и сахара. При этом в качестве водорастворимых поли-

меров использованы производные целлюлозы, или поливинилпирролидоны низко- или среднемoleкулярные, или полиэтиленгликоли с молекулярной массой 4000 или 6000, или натрия альгинат, а из сахаров — лактоза и(или) маннит, а в качестве производных целлюлозы использованы натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, или оксипропилметилцеллюлоза, или оксипропилцеллюлоза. Фармацевтическая композиция содержит вещества в следующем соотношении ингредиентов, массовые %: кальция карбонат — 70,0–85,0; лактоза и(или) маннит — 5,0–15,0; полимер водорастворимый — 0,1–1,0; карбоксиметилкрахмал — 1,0–4,0; микрокристаллическая целлюлоза — 2,0–8,0; магния или кальция стеарат — 0,25–1,0. Авторами показана применимость названной композиции для производства бактериофагов клебсиелл и сальмонелл, дизентерийного бактериофага и секстафага (пиобактериофага).

Разработана технология производства таблетированной лекарственной формы бактериофага «Секстафаг», предназначенного для пероральной фаготерапии инфекционных заболеваний [9, 11]. Основные результаты были следующие. В результате изучения влияния вспомогательных веществ (всего в экспериментах использовалось 18 наименований) на стабильность секстафага подобрана оптимальная композиция состава таблеток (метилцеллюлоза : сорбит : лактоза : кальция карбонат : натрия альгинат в соотношении 3:10:25:55:7 соответственно). Выявлено, что предварительная стабилизация бактериофагов в фармацевтической композиции метилцеллюлозой, сорбитом и лактозой с последующим добавлением остальных наполнителей значительно повышает активность фагов в таблетированном препарате; при этом сохранение литической активности бактериофагов в таблетках обеспечивает высушивание полуфабриката с соотношением бактериофага и наполнителей от 1,1:1 до 1,25:1 с последующим размолотом. В результате изучения влияния массы таблетки на кислотоустойчивость установлено, что таблетки массой более 150 мг обладали большей желудочной резистентностью. Показана предпочтительность производства препарата в форме двояковыпуклых таблеток диаметром 7 мм в сравнении с плоскоцилиндрическими. Подобран оптимальный диапазон давления прессования, который составил от 80 до 160 МПа. Результаты изучения фармакокинетики жидкого и таблетированного препаратов при пероральном пути введения выявили преимущества таблетированной лекарственной формы.

Продолжением вышеописанных исследований являлась разработка технологии производства таблет-

рованной лекарственной формы поливалентных бактериофагов [12, 15]. Ими решена задача создания желудочно-резистентных таблеток бактериофагов без оболочки с высокой литической активностью (для комплексного препарата «Секстафаг» (пиобактериофаг поливалентный) и бактериофага сальмонеллезного гр. А, В, С, D, E). Данный результат был достигнут за счет подбора биофармацевтической композиции (наполнители, массовые %: метилцеллюлоза — 0,5–4,0; лактоза — 5,0–25,0; сорбит — 5,0–15,0; кальция карбонат — 55,0–75,0; натрия альгинат — 5,0–12,0; кальция или магния стеарат — 0,25–1,0 и бактериофаги с титром по Апфельману не менее 10^{-3} с соотношением от 1:1 до 1,25:1) и ряда технологических приемов. Технологические особенности были следующие. К стерильным фаголизатам бактерий с титром по Апфельману не менее 10^{-3} добавляли стабилизатор (метилцеллюлозу, сорбит и лактозу) до полного растворения. В этот гелеобразный раствор вносили смесь кальция карбоната с натрия альгинатом, перемешивали до состояния гомогенной пастообразной массы. Соотношение наполнителей и фага 1:1,2. Полученную массу разливали в кассеты, замораживали в течение 24 ч при температуре минус 50 ± 2 °С, сублимационно высушивали в аппарате LZ 45-27 в течение 46 ± 2 ч до температуры 35 ± 3 °С и ПМВ 2–4%. Сухую массу гранулировали через сито с размером отверстий 1 мм, опудривали кальция или магния стеаратом и прессовали под давлением 120–160 МПа в таблетки диаметром 7 мм двояковыпуклой формы массой 0,16–0,2 г (в зависимости от соотношения наполнителей и бактериофага).

Также представлены данные по изучению влияния технологических факторов на показатели качества таблеток на основе лиофилизированного сальмонеллезного бактериофага [6]. Анализ технологических свойств гранулятов по параметрам насыпная плотность, сыпучесть, коэффициент вибрационного уплотнения, индекс Hausner, индекс Carr's показал, что фракционный состав гранул должен содержать не более 33% пылевидной фракции (0,25 мм и менее). Гранулят независимо от фракционного состава обладал упруго-пластичными свойствами, характеризующими прочность таблеток. Изучено влияние давления прессования таблеток лиофилизированной композиции с сальмонеллезным бактериофагом на показатели прочности на раздавливание и распадаемость кишечнорастворимых таблеток. Установлено оптимальное давление прессования таблеток в пределах 60 МПа гранулятов с содержанием массовой долей пылевидной фракции (0,25 мм и менее) не более 33%.

Разработана технология капсулированной лекарственной формы Секстафаг® [7]. Для разработки ЛП Секстафаг® капсулы, использовалась субстанция — жидкий комбинированный поливалентный бактериофаг Секстафаг® (Пиобактериофаг поливалентный), представляющий смесь фильтратов фаголизатов бактерий *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, энтеропатогенных *E. coli*. В качестве вспомогательных веществ использовали метилцеллюлозу, сорбит, лактозу (молочный сахар), кальция карбонат, натрия альгинат, пектин яблочный, магния стеарат, капсулы твердые желатиновые (Capsugel, Бельгия, № 2).

Разработка препарата включала в себя подбор фармацевтической композиции, отвечающей технологическим и биофармацевтическим требованиям. Технологические требования для гранулята были следующие: однородность массы дозирования, % — ± 10 ; уплотненная насыпная плотность, кг/м³, — 600–650; сыпучесть, г/с — не менее 2; угол естественного откоса, градусы — не более 45. Биофармацевтические требования для готовой лекарственной формы были следующие: литическая активность, титр — не менее 10^{-3} ; желудочная резистентность титр — не менее 10^{-2} ; распадаемость, мин — не более 30. В результате была обоснована следующая композиция, расфасованная в капсулы при следующем соотношении компонентов, мас. %: бактериофаг Секстафаг® — 1,5–3,0; метилцеллюлоза — 5,0–35,0; лактоза — 2,5–5,0; сорбит — 50,0–75,0; кальция карбонат — 0,5–4,5; натрия альгинат — 0,5–15,0; пектин — 0,25–1,0; кальция или магния стеарат — 0,25–1,0.

В качестве примера получения препарата описаны следующие технологические приемы. Стерильные фильтраты фаголизатов бактериофагов с титром не менее 10^{-5} концентрировали в 10–100 раз с помощью мембранной ультрафильтрации до титра по Апфельману не менее 10^{-6} . Затем полученные концентраты подвергали стерилизующей фильтрации через микропористые мембраны (капсулы) с размером пор 0,45–0,2 мкм. Целевые добавки перед введением в бактериофаг предварительно стерилизовали в сушильно-стерилизационном шкафу. К концентрированному бактериофагу добавляли смесь метилцеллюлозы 3,0 г, сорбита 5,0 г и лактозы 30,0 г. После получения гомогенной гелеобразной массы добавляли смесь кальция карбоната 52,0 г, натрия альгината 4,0 г и пектина 2,0 г. После гомогенизации полученную густую пастообразную массу выкладывали в кассеты, накрывали стерильной тканью и высушивали в сублимационной установке до ПМВ 1–4%. Сухую массу

гранулировали, опудривали стерильной массой целевых добавок (вспомогательных антифрикционных веществ 1,0 г магния стеарата (или кальция стеарата), тщательно перемешивали и расфасовывали в капсулы.

По вышеперечисленным процедурам были также получены комплексный поливалентный бактериофаг «Интести-бактериофаг», представляющий собой смесь стерильных очищенных фаголизатов бактерий *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, энтеропатогенных *E. coli* различных серогрупп, *Salmonella* групп А, В, С, D, *Shigella* (*Sh. flexneri* 1, 2, 3, 4, 6 сероваров, *Sh. sonnei*); бактериофаг сальмонеллезный групп А, В, С, D, Е представляющий собой смесь стерильных фильтратов фаголизатов наиболее распространенных сальмонелл (гр. А — *S. paratyphi* А; гр. В — *S. paratyphi* В, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*; гр. С — *S. newport*, *S. choleraesuis*, *S. oranienburg*, *S. infantis*; гр. D — *S. dublin*, *S. enteritidis*; гр. Е — *S. anatum*, *S. newlands*); бактериофаг дизентерийный поливалентный, представляющий собой смесь стерильных фильтратов фаголизатов бактерий *Shigella* (*Sh. flexneri* 1, 2, 3, 4 и 6 сероваров, *Sh. sonnei*) [13, 14].

В патенте РФ 2520346 раскрыты технологические особенности ряда бактериофагов в таблетках с желудочно-резистентным покрытием (стафилококковый; дизентерийный; секстафага, представляющего собой смесь шести фагов: стафилококков, стрептококков, синегнойной палочки, кишечной палочки, клебсиелл и протей; сальмонеллезного) [2]. Следует отметить, что методические приемы для всех видов бактериофагов идентичны, поэтому рассмотрению подверглась технология приготовления стафилококкового бактериофага. К 1,05 л фаголизата с титром по Апфельману не менее 10^7 добавляют 0,006 кг полимера (например, МаКМЦ). После полного растворения полимера смесь соединяют с наполнителем из кальция карбоната и лактозы или маннита в соотношении 80:15 мас.ч. К 1 л фаголизата добавляют 0,15–0,25 кг наполнителя. После тщательного перемешивания влажную массу выкладывают тонким слоем на дно кассеты, накрывают стерильной тканью и сушат в сублимационной установке при вакууме 7,0–15 Па в течение 28–32 ч до ПМВ 3–4%. Массу протирают через сито с размером отверстий 1 мм, соединяют со стерильной смесью технологических добавок из микрокристаллической целлюлозы, карбоксиметилкрахмала, кальция или магния стеарата в соотношении 3:1:1 — 4:2:1 из расчета 15–20% от таблетлируемой сухой массы, тщательно перемешивают, прессуют в таблетки и покрывают желудочно-резистентной оболочкой. Одна

таблетка массой 0,09–0,11 г эквивалентна 20 мл жидких бактериофагов стафилококков с титром не ниже 10^4 (по Апфельману).

Изучены возможности микрокапсулирования клебсиеллезного бактериофага [8]. Был использован жидкий коммерческий препарат — клебсиеллезный бактериофаг, представляющий собой стерильный фильтрат фаголизата бактерий *K. pneumoniae*. Для получения микрокапсул бактериофаг предварительно концентрировали в 100 раз с применением метода мембранной ультрафильтрации до минимального титра 10^7 .

Получение микрокапсул осуществляли несколькими способами. При перемешивании в дисперсионную среду вазелинового масла струйно добавляли раствор клебсиеллезного бактериофага в виде биополимерного гидрогеля на основе натрия альгината, который диспергировался на капельки различной величины. К эмульсии добавляли сшивающий агент (порошок кальция хлорида), в результате происходило отверждение оболочки микрокапсул. Полученные микрокапсулы имели неправильную форму, размер варьировал от 26 до 300 мкм. При этом способе возникали трудности при отделении микрокапсул от дисперсионной среды вазелинового масла, так как промывание органическим растворителем приводило к снижению литической активности бактериофага. Другим вариантом микрокапсулирования являлось добавление к эмульсии (раствор бактериофага в виде биополимерного гидрогеля/дисперсионная среда вазелинового масла) водного раствора сшивающего агента, в результате происходило отверждение оболочки микрокапсул. При отстаивании эмульсия расслаивалась на верхний слой — вазелиновое масло и нижний — водный раствор с микрокапсулами. Последние отделяли от дисперсионной среды, промывали раствором сшивающего агента и высушивали. Размер полученных микрокапсул варьировал от 66 до 1250 мкм. Данный способ имел ряд недостатков: трудоемкость процесса, полученные микрокапсулы неоднородны по размеру, технологические свойства (сыпучесть, плотность) не соответствовали нормативной документации, наблюдалось снижение активности клебсиеллезного бактериофага. С целью оптимизации технологии клебсиеллезный бактериофаг в виде биополимерного гидрогеля капельно вводили в диспергируемый водный раствор кальция хлорида, что показало возможность получать микрокапсулы с хорошими органолептическими и технологическими показателями и с сохранением активности фага.

Проведен подбор концентрации биополимерной матрицы-носителя клебсиеллезного бактериофага с

концентрацией от 0,25 до 3,0%. При введении в водный раствор кальция хлорида геля натрия альгината в концентрации 0,5% и менее образования капсул не наблюдалось. При концентрации матрицы-носителя 2,5% и выше отмечалась трудность дозирования из-за высокой вязкости геля. В результате капсулы имели неправильную форму и высокий показатель отклонения однородности дозирования. Оптимальными технологическими характеристиками обладали капсулы, полученные на полимерном носителе с концентрацией от 1,0 до 2,0%. Выявлено, что микрокапсулы, полученные на 2%-ном геле натрия альгината имели наименьший процент отклонения по массе, чем капсулы составов на 1,0- и 1,5%-ном геле, что говорило об однородности дозирования бактериофага.

Следующим этапом являлся подбор фармацевтической композиции, стабилизирующей бактериофаг. В композиции микрокапсулируемых составов в различных соотношениях входили: кальция карбонат, кальция глюконат, лактоза, сорбит, натрия альгинат, пектины цитрусовый и яблочный. Наилучшая стабильность бактериофагов наблюдалась в присутствии сахаров — сорбита, лактозы, маннита и высокомолекулярного соединения — метилцеллюлозы. Лактоза плохо растворима в жидком бактериофаге, гель для микрокапсулирования представлял собой суспензию, что негативно сказывалось на органолептических и технологических свойствах микрокапсул. Стабилизация метилцеллюлозой, а после — добавление к гелевой композиции натрия альгината приводило к изменению формы. Микрокапсулы приобретали неправильную, вытянутую форму. Добавление сорбита не влияло на изменение органолептических и технологических показателей. Сохранение активности фага в полученных композициях варьировало: $10^{-2,75}$ — $10^{-3,5}$.

Далее процедура экспериментальных исследований состояла в изучении вида и режима сушки микрокапсул и влияния их на технологические характеристики и стабильность бактериофага. Сушку сформированных микрокапсул данных серий проводили двумя способами: воздушным и вакуумным. Воздушную сушку — при температуре 26–28 °С. Вакуумную — при температуре 32–35 °С, глубине вакуума — от 0,02 до 0,1 МПа. При воздушной сушке микрокапсулы обладали оптимальными технологическими и органолептическими свойствами, но показали низкую стабильность в сравнении с вакуумной сушкой. Литическая активность падала в 1,8 раза в сравнении с активностью клебсифага в капсулах до высушивания и составляла $10^{-2,25 \pm 0,59}$. При получении серий микрокапсул с вакуумным высушиванием выявлено, что многократное вакуумное подсушивание (сброс вакуума и

открытие дверцы сушильного шкафа) ведет к снижению литической активности бактериофагов. При высушивании сформированных микрокапсул под вакуумом 0,1 МПа микрокапсулы расслаивались, приобретали плоскую форму, но сохраняли литическую активность на уровне $10^{-3,625 \pm 0,43}$. Оптимальными органолептическими и технологическими показателями обладали микрокапсулы, высушенные по режиму при постепенном создании глубины вакуума: от 0,02 МПа — к 0,04 МПа — к 0,06 МПа — к 0,08 МПа — к 0,1 МПа, но при этом выявлено снижение активности бактериофага, которая составила $10^{-2,875 \pm 0,54}$. Наилучшими технологическими параметрами вакуумной сушки микрокапсул являлось: однократное высушивание и определенное значение средней глубины вакуума. Литическая активность данных микрокапсулированных композиций была на уровне $10^{-3,5 \pm 0,45}$.

Обоснованная технология получения микрокапсул с клебсиеллезным бактериофагом включала: получение 2%-ного раствора полимера натрия альгината на основе жидкого бактериофага; капельное смешивание гомогенного раствора с дисперсионной средой отверждающего агента 5%-ного раствора кальция хлорида с образованием капсул; фильтрование капсул; сушка однократным циклом под вакуумом при глубине вакуума — 0,05 МПа. Микрокапсулы фасовали в стеклянные флаконы под обкатку. Одна микрокапсула размером 1500 мкм и весом 3 мг, приготовленная на концентрированном клебсиеллезном бактериофаге, была эквивалентна по объему 20 мл жидкого коммерческого препарата «Клебсифаг».

По внешнему виду микрокапсулы представляли собой капсулы сферической формы, бежевого цвета или с зеленоватым оттенком, без запаха и со специфическим привкусом. 4 микрокапсулы, соответствующие 20 мл жидкого коммерческого препарата «Клебсифаг» имели массу $3,3887 \pm 0,3181$ мг, толщину — $1408,57 \pm 133,55$ мкм. Потеря в массе при высушивании составляла 1,8%. Через 6 месяцев после хранения микрокапсул «Клебсифаг» в герметично закрытом флаконе при температуре от 6 до 8 °С органолептические и технологические свойства, а также активность оставались на исходном уровне. Выявлено, что в микрокапсулированной форме сохранение активности клебсиеллезного бактериофага после воздействия кислой среды в 5,5 раза выше, чем в жидкой, что говорит о том, что разработанные микрокапсулы «Клебсифаг» обладают большей биодоступностью в сравнении с жидким бактериофагом.

Необходимо отметить, что по состоянию на июль 2021 года в ГРЛС России имеется информация об 16 наименований бактериофагов, из них 13 предназначены

для лечения и профилактики, в том числе, кишечных инфекций. И только 2 наименования производятся в твердой лекарственной форме. В связи с вышесказанным уместно привести цитату из статьи Казьянина А.В. с соавт.: «Кислая среда желудочного сока оказывает инактивирующее действие на жидкие бактериофаги, применяемые перорально, поэтому требуется создание других лекарственных форм бактериофагов — таблеток и суппозиторий, что также необходимо для придания препарату лучшего товарного вида, уменьшения его объемов при транспортировании и хранении» [4]. На наш взгляд, объяснение тому, что 75% бактериофагов, используемых для лечения и профилактики кишечных инфекций, производятся в форме раствора, скрывается в нежелании увеличения материально-финансовых затрат, которые неизбежно возникают при производстве твердых лекарственных форм препаратов.

Заключение

В результате проведенного обзора отечественной литературы, посвященной вопросам получения твердых форм лекарственных бактериофагов, констатируется, что основной формой являются таблетки и капсулы; при этом официально зарегистрированные препараты производятся только в форме таблеток. Определен спектр вспомогательных веществ, используемых в технологии производства лекарственных бактериофагов. При этом нужно указать на то, что сходный перечень вспомогательных веществ обнаружен нами при обзоре литературы, посвященной лиофилизации живых вакцин [16]. Отмечена перспективность технологии микрокапсулирования препаратов. Подтверждено, что получение лекарственных бактериофагов в твердой форме минимизирует негативное влияние на специфическую активность препарата кислотно-щелочной среды желудочно-кишечного тракта.

Литература

1. Алёшкин В.А., Рубальский О.В., Афанасьев С.С., Алёшкин А.В., Гаврин А.Г., Амерханова А.М., Логунов О.В., Киселёва И.А., Пугачёва Т.Г., Давыдкин В.Ю., Афанасьев Д.С., Рубальский Е.О., Голикова В.М., Давыдкин И.Ю. Иммунобиологический бактерицидный препарат (варианты) // Патент РФ 2366708. С12N 7/00. 2009.
2. Аникина Т.А., Горлова И.С., Рязанова С.Х., Конькова Н.К., Николаева А.М., Казьянин А.В., Ковязина Н.А., Функнер Е.В., Ефимова М.Г., Шитова О.И., Грязнова Д.В., Ворошилова Н.Н., Боговазова Г.Г., Усманова С.С.,

- Казакова Т.Б. Фармацевтическая композиция для лечения и профилактики бактериальной инфекции // Патент РФ 2520346. А61К 35/66. 2014.
3. Быков А.С., Быков С.А. Бактериофаги и их клиническое значение // Фарматека. — 2011. — № 5. — С. 67–72.
4. Казьянин А.В., Орлова Е.В., Ефимова М.Г., Функнер Е.В., Шитова О.И. Бактериофаги: Опыт производства и применения // Фармация. — 2010. — № 3. — С. 36–37.
5. Каменева М.А. Использование Д'Эреллем бактериофага для лечения чумы. К 100-летию открытия бактериофага Д'Эреллем // International Research Conference on Economics, Arts and Sciences: Conference Proceedings, Sweden, Uppsala, 31 июля 2017 года. — Sweden, Uppsala: Smashwords, Inc., 2017. — С. 369–384.
6. Ковязина Н.А. Изучение влияния фракционного состава гранулята на показатели качества таблеток на основе сальмонеллезного бактериофага // Дальневосточный медицинский журнал. — 2020. — № 4. — С. 74–77.
7. Ковязина Н.А., Николаева А.М., Функнер Е.В. Разработка состава и исследование капсулированной лекарственной формы Секстафаг® // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2020. — № 1. — С. 75–80.
8. Ковязина Н.А., Николаева А.М., Функнер Е.В., Ефимова М.Г. Изучение возможности микрокапсулирования бактериофага // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. — 2014. — № 24(195). — С. 205–210.
9. Ковязина Н.А., Решетников В.И. Проблемы и перспективы разработки лекарственных форм бактериофагов // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. — 2007. — № 2. — С. 339–344.
10. Ковязина Н.А., Решетников В.И., Функнер Е.В., Ефимова М.Г. Разработка состава и технологии желудочно-резистентных таблеток «Секстафаг» // Фарматека. — 2008. — № 7. — С. 36–39.
11. Ковязина Н.А., Решетников В.И., Функнер Е.В., Ефимова М.Г. Разработка рациональной лекарственной формы «Секстафаг» для пероральной фаготерапии инфекционных заболеваний // Российский иммунобиологический журнал. — 2003. — Т. 2(11). — № 2–3. — С. 249.
12. Ковязина Н.А., Решетников В.И., Функнер Е.В., Ефимова М.Г., Шитова О.И. Фармацевтическая композиция на основе секстафага (пиобактериофага поливалентного) или бактериофага сальмонеллезного и способ ее получения // Патент РФ 2410084. А61К 9/20. 2011.
13. Ковязина Н.А., Функнер Е.А., Николаева А.М., Орлова Е.В., Ефимова М.Г., Шитова О.И. Антибактериальная фармацевтическая композиция для перорального применения, содержащая бактериофаги // Патент РФ 2660355 Российская Федерация. А61К 35/74. 2018.

14. Ковязина Н.А., Функнер Е.В., Николаева А.М., Орлова Е.В., Ефимова М.Г., Шитова О.И. Технологические аспекты разработки капсул с бактериофагами // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2015. — № 1. — С. 132–136.
15. Ковязина Н.А., Функнер Е.В., Шитова О.И., Решетников В.И., Ефимова М.Г. Характеристика свойств таблетированной лекарственной формы поливалентных бактериофагов // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2010. — № 2. — С. 14–16.
16. Комиссаров А.В., Бибииков Д.Н., Волох О.А., Бадарин С.А., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Германчук В.Г., Никифоров А.К. Лиофилизация живых вакцин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 3. — С. 56–73.
17. Красильников И.В., Лыско К.А., Отрашевская Е.В., Лобастова А.К. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития // Сибирский медицинский журнал. — 2011. — Т. 26. — № 2. — С. 33–37.
18. Кривошеева С.Э., Мейпариани А.Н., Нишнанидзе О.А., Мгалоблишвили Н.П., Овсянко Т.А., Месхи Т.Ш., Чанишвили Л.Г., Лиадзе Л.Ш., Майсурадзе Н.А. Способ получения сухого бактериофага // Авторское свидетельство СССР 172960. А61К. 1965.
19. Насибуллин И.Х. Разработка технологии производства лечебно-профилактических препаратов очищенного концентрированного стафилококкового бактериофага: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1993. — 25 с.
20. Нигматуллин Т.Г., Вискова Р.С., Горбаткова Г.А., Валеева Т.С. Лечебно-профилактический дизентерийный бактериофаг и способ его получения // Патент СССР 653786. А61К 35/76. 1999.
21. Присада Т.В., Ефимова М.Г., Дабигева А.Н., Ворошилова Н.Н. Фаги атакуют. Отечественная история производства и применения бактериофагов // Наука из первых рук. — 2016. — № 4(70). — С. 22–31.
22. Решетников В.И., Казьянин А.В., Ефимова Н.П., Каменева М.А. Фармацевтическая композиция, содержащая бактериофаги, и способ ее получения // Патент РФ 2241446. А61К 9/20. 2004.
23. Сергиенко Ф.Е. Способ получения сухого бактериофага // Авторское свидетельство СССР № 64612. 1945.
24. Чалов В.В., Алешкин В.А., Галимзянов Х.М., Афанасьев С.С., Рубальский О.В., Александян И.Ю., Амерханова А.М., Дубина Д.Ш., Гаврин А.Г., Алешкин А.В., Ермолаев В.В., Подледнева Н.А., Мартынов А.В., Лобачев Н.В., Галимзянова А.Х., Рубальский Е.О., Афанасьев М.С., Афанасьев Д.С. Композиция для перорального применения, содержащая непатогенные микроорганизмы, обладающая способностью нормализовать микрофлору

кишечника (варианты) // Патент РФ 2453320. А61К 35/66. 2012.

References

1. Aloskin VA, Rubal'skiy OV, Afanas'yev SS, Aloskin AV, Gavrin AG, Amerkhanova AM, Logunov OV, Kiselova IA, Pugachova TG, Davydkin VYu, Afanas'yev DS, Rubal'skiy YeO, Golikova VM, Davydkin IYu. Immunobiologicheskii bakteritsidnyy preparat (varianty). Patent RF 2366708. C12N 7/00. 2009 (in Russian).
2. Anikina TA, Gorlova IS, Ryazanova SKh, Kon'kova NK, Nikolayeva AM, Kaz'yanin AV, Kovyazina NA, Funkner YeV, Yefimova MG, Shitova OI, Gryaznova DV, Voroshilova NN, Bogovazova GG, Usmanova SS, Kazakova TB. Farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya lecheniya i profilaktiki bakterial'noy infektsii. Patent RF 2520346. А61К 35/66. 2014 (in Russian).
3. Bykov AS, Bykov SA. Bakteriofagi i ikh klinicheskoye znachenije. Farmateka 2011; 5:67–72 (in Russian).
4. Kaz'yanin AV, Orlova YeV, Yefimova MG, Funkner YeV, Shitova OI. Bakteriofagi: Opyt proizvodstva i primeneniya. Farmatsiya 2010; 3:36–37 (in Russian).
5. Kameneva MA. Ispol'zovaniye D'Erellem bakteriofaga dlya lecheniya chumy. K 100-letiyu otkrytiya bakteriofaga D'Erellem. International Research Conference on Economics, Arts and Sciences: Conference Proceedings, Sweden, Uppsala, 31 iyulya 2017 goda. Sweden, Uppsala: Smashwords, Inc., 2017: 369–384 (in Russian).
6. Kovyazina NA. Izucheniye vliyaniya fraktsionnogo sostava granulyata na pokazateli kachestva tabletok na osnove sal'monelleznogo bakteriofaga. Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal 2020; 4:74–77 (in Russian).
7. Kovyazina NA, Nikolayeva AM, Funkner YeV. Razrabotka sostava i issledovaniye kapsulirovannoy lekarstvennoy formy Sekstafag®. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya 2020; 1:75–80 (in Russian).
8. Kovyazina NA, Nikolayeva AM, Funkner YeV, Yefimova MG. Izucheniye vozmozhnosti mikroksulirovaniya bakteriofaga. Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya 2014; 24(195):205–210 (in Russian).
9. Kovyazina NA, Reshetnikov VI. Problemy i perspektivy razrabotki lekarstvennykh form bakteriofagov. Vestnik Permskoy gosudarstvennoy farmatsevticheskoy akademii 2007; 2:339–344 (in Russian).
10. Kovyazina NA, Reshetnikov VI, Funkner YeV, Yefimova MG. Razrabotka sostava i tekhnologii zheludochno-rezistentnykh tabletok «Sekstafag». Farmateka 2008; 7:36–39 (in Russian).
11. Kovyazina NA, Reshetnikov VI, Funkner YeV, Yefimova MG. Razrabotka ratsional'noy lekarstvennoy formy «Sek-

- stafag» dlya peroral'noy fagoterapii infektsionnykh zabolevaniy. Rossiyskiy immunobiologicheskiy zhurnal 2003; 2(2–3):249 (in Russian).
12. Kovyazina NA, Reshetnikov VI, Funkner YeV, Yefimova MG, Shitova OI. Farmatsevticheskaya kompozitsiya na osnove sekstafaga (piobakteriofaga polivalentnogo) ili bakteriofaga sal'monelleznogo i sposob yeye polucheniya. Patent RF 2410084. A61K 9/20. 2011 (in Russian).
 13. Kovyazina NA, Funkner YeA, Nikolayeva AM, Orlova YeV, Yefimova MG, Shitova OI. Antibakterial'naya farmatsevticheskaya kompozitsiya dlya peroral'nogo primeneniya, sodержashchaya bakteriofagi. Patent RF 2660355 Rossiyskaya Federatsiya. A61K 35/74. 2018 (in Russian).
 14. Kovyazina NA, Funkner YeV, Nikolayeva AM, Orlova YeV, Yefimova MG, Shitova OI. Tekhnologicheskiye aspekty razrabotki kapsul s bakteriofagami. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya 2015; 1:132–136 (in Russian).
 15. Kovyazina NA, Funkner YeV, Shitova OI, Reshetnikov VI, Yefimova MG. Kharakteristika svoystv tabletirovannoy lekarstvennoy formy polivalentnykh bakteriofagov. Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye 2010; 2:14–16 (in Russian).
 16. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, Germanchuk VG, Nikiforov AK. Liofilizatsiya zhivykh vaksin. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova 2018; 14(3):56–73 (in Russian).
 17. Krasil'nikov IV, Lysko KA, Otrasheskaya YeV, Lobastova AK. Preparaty bakteriofagov: kratkiy obzor sovremennogo sostoyaniya i perspektiv razvitiya. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal 2011; 26(2):33–37 (in Russian).
 18. Krivosheyeva SZ, Meypariani AN, Nishnianidze OA, Mgaloblishvili NP, Ovsyanko TA, Meskhi TSh, Chanishvili LG, Liadze LSh, Maysuradze NA. Sposob polucheniya sukhogo bakteriofaga. Avtorskoye svidetel'stvo SSSR 172960. A61K. 1965 (in Russian).
 19. Nasibullin IKh. Razrabotka tekhnologii proizvodstva lechebno-profilakticheskikh preparatov ochishchennogo kontsentrirovannogo stafilokokkovogo bakteriofaga: avtoref dis ... kand biol nauk. Moscow, 1993: 25 (in Russian).
 20. Nigmatullin TG, Viskova RS, Gorbatkova GA, Valeyeva TS. Lechebno-profilakticheskiy dizenteriyunnyy bakteriofag i sposob yego polucheniya. Patent SSSR 653786. A61K 35/76. 1999 (in Russian).
 21. Prisada TV, Yefimova MG, Dabizheva AN, Voroshilova NN. Fagi atakuyut. Otechestvennaya istoriya proizvodstva i primeneniya bakteriofagov. Nauka iz pervykh ruk 2016; 4(70):22–31 (in Russian).
 22. Reshetnikov VI, Kaz'yanin AV, Yefimova NP, Kameneva MA. Farmatsevticheskaya kompozitsiya, sodержashchaya bakteriofagi, i sposob yeye polucheniya. Patent RF 2241446. A61K 9/20. 2004 (in Russian).
 23. Sergiyenko FYe. Sposob polucheniya sukhogo bakteriofaga. Avtorskoye svidetel'stvo SSSR № 64612. 1945 (in Russian).
 24. Chalov VV, Aleshkin VA, Galimzyanov KhM, Afanas'yev SS, Rubal'skiy OV, Aleksanyan IYu, Amerkhanova AM, Dubina DSh, Gavrin AG, Aleshkin AV, Yermolayev VV, Podledneva NA, Martynov AV, Lobachev NV, Galimzyanova AKh, Rubal'skiy YeO, Afanas'yev MS, Afanas'yev DS. Kompozitsiya dlya peroral'nogo primeneniya, sodержashchaya nepatogennyye mikroorganizmy, obladayushchaya sposobnost'yu normalizovat' mikrofloru kishchnika (varianty). Patent RF 2453320. A61K 35/66. 2012 (in Russian).

SOLID FORMS OF MEDICINAL BACTERIOPHAGES (REVIEW OF THE LITERATURE)

A.V. KOMISSAROV¹, M.V. OVCHINNIKOVA¹, D.N. BIBIKOV¹, N.V. SINITSYNA¹,
E.A. GLAZKOVA¹, K.S. GUMAYUNOVA¹, O.S. ZININA¹, A.K. NIKIFOROV^{1,2}

¹Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rosпотребнадзор,

²Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov

A review of the domestic literature on the preparation of solid forms of medicinal bacteriophages is presented in this paper. The information of the State Register of Medicines in the Russian Federation, as of mid-2021, on registered drugs with a grouping (chemical) name – bacteriophage in solid dosage form was analyzed and their characteristics are given. The data on the qualitative and quantitative composition of excipients used in drying, producing tablets and capsules are considered. A number of examples show the influence of technological parameters of obtaining solid forms of medicinal bacteriophages on the quality of drugs. It has been confirmed that obtaining medicinal bacteriophages in solid form minimizes the effect of the acidic environment of the stomach on them. The carried out study of scientific and patent periodicals makes it possible to take into account the influence of the factors described in the article when creating a technology for the manufacture of therapeutic bacteriophages.

Keywords: medicinal bacteriophages, lyophilization, excipients, tablets, capsules.

Address:

Komissarov A.V., Dr. Biol. Sci.,
Prof., Chief Researcher, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»
of the Rospotrebnadzor, Saratov,
E-mail: Komissarov-9@yandex.ru

Для цитирования:

Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Бибиков Д.Н., Сеницына Н.В., Глазкова Е.А., Гумаюнова К.С., Зинина О.С., Никифоров А.К. Твердые формы лекарственных бактериофагов (обзор литературы). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(4):55–64.

For citation:

Komissarov A.V., Ovchinnikova M.V., Bibikov D.N., Sinityna N.V., Glazkova E.A., Gumayunova K.S., Zinina O.S., Nikiforov A.K. Solid forms of medicinal bacteriophages (review of the literature). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(4):55–64 (in Russian).

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ПРИМЕНЕНИИ НЕЙРОСЕТЕВЫХ АЛГОРИТМОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

П.С. НАЗИН*, К.В.ГОРИН, П.М. ГОТОВЦЕВ, Р.Г. ВАСИЛОВ

Научный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Авторами представлен обзор данных об искусственных нейронных сетях (ИНС), включая многослойные перцептронные ИНС с обратным распространением ошибки, ИНС с глубоким обучением и сверточные ИНС. Также были рассмотрены современные наработки: по улучшению производительности ИНС, по преодолению различных недостатков, возникающих при их практическом применении, по успешности использования различных типов ИНС в разных областях биологии, микробиологии, медицины и смежных дисциплин. Обращено внимание на возможности использования ИНС для работы с фототрофными микроорганизмами.

Ключевые слова: искусственные нейронные сети, нейросетевые алгоритмы, биотехнология, фототрофные микроорганизмы, цианобактерии, фикоцианин.

Введение

Искусственные нейронные сети — класс моделей, построенных с использованием алгоритмов машинного обучения. Работа нейронных сетей опирается на принцип коннекционизма — предположения о том, что сложные мыслительные явления могут быть описаны при помощи сетей из относительно простых взаимосвязанных элементов, построенных по аналогии с организацией нейронных сетей в живых организмах. ИНС имитируют поведение моделируемой системы, обучаясь на основе имеющихся данных, полученных экспериментальными или другими методами. Во многих случаях это позволяет пропустить сложный этап создания алгоритмической/механической модели, необходимой для описания системы и решения связанных с ней задач при традиционном подходе, представляющий значительные трудности для сложных и нелинейных систем, часто встречающихся в задачах из области биологии [39]. Распространенным недостатком нейронных сетей и методов на их основе является длительный процесс обучения, что ограничивает возможности их применения в случаях, где требуется внесение корректировочных изменений в систему в режиме реального времени. Потребность в

больших объемах данных для достижения достаточного качества обучения и в работе по принципу «черного ящика» — построение алгоритмической/механической модели на основе нейронной сети или определение отдельных ключевых причинно-следственных связей между входными и выходными данными — представляет отдельную задачу [16].

Искусственные нейронные сети

Основным конструктивным элементом нейронных сетей является перцептрон — искусственный нейрон — математический элемент, схема которого приведена на рисунке 1.

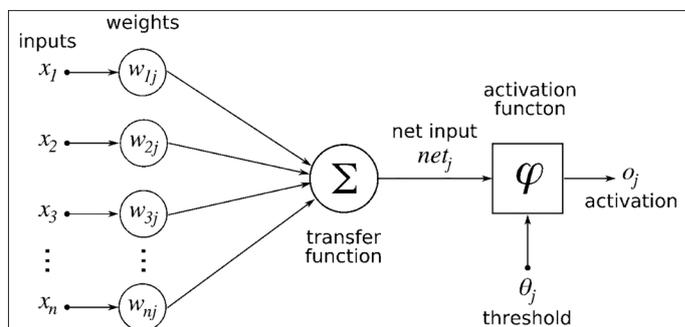


Рис. 1. Принципиальная схема устройства перцептрона

Эти элементы связаны между собой с некоторыми весами, образуя сеть, и имеют внутри себя активаторные функции, преобразующие поступающие данные, чаще всего достаточно простым образом. Процесс обучения

такой искусственной нейронной сети заключается в последовательной настройке весов на связях между различными нейронами, пока не будет достигнут требуемый результат на тренировочном наборе данных, что может занимать долгое время. Следовательно, ИНС работает как единое целое, получая на вход данные, типично представленные в виде численного вектора, пропуска-

ющее их через последовательность преобразований на перцептроне и выдающее на выход результат обработки этих данных: принципиальная схема этого приведена на рисунке 2. Подобным образом может быть описано поведение самых разных систем — от предсказания роста фототрофных микроорганизмов до распознавания изображений [22, 39].

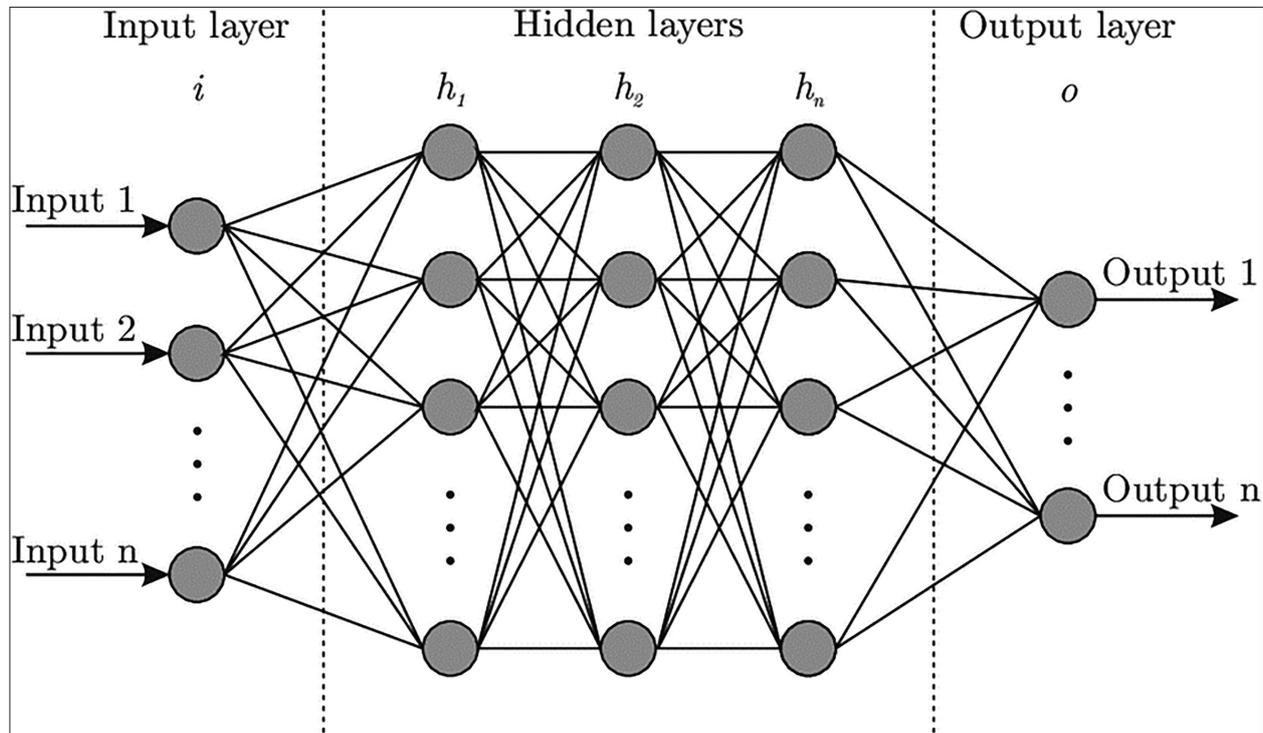


Рис. 2. Принципиальная схема устройства искусственной нейронной сети

В настоящее время искусственные нейронные сети достаточно широко используются для решения задач, имеющих дело с механически сложными и включающих в себя нелинейные связи системами. Создание модели на основе ИНС не требует предварительной аналитической модели системы, вместо чего для обучения хватит использования достаточно большого объема данных о поведении системы, полученных в большинстве случаев экспериментальных данных. Такая модель позволяет получать хорошие результаты при сравнительно небольших затратах на разработку по сравнению с алгоритмическим решением сложной задачи. Тем не менее она работает по принципу «черного ящика» — дальнейшее изучение природы внутренних связей в системе, исходя из устройства обученной нейросетевой модели, представляет отдельную задачу [16, 21, 41]. Это является значительным недостатком такого подхода по сравнению с классическими моделями, что оставляет их предпочтительными в случаях, когда система может быть описана алгоритмически при затратах, сравнимых с затратами на построение

нейросетевой модели. После анализа синаптических весов тренированной ИНС — например, с помощью модифицированного алгоритма Гарсона [37, 40], — можно в некоторой степени составить представление об относительной значимости составных элементов среды, таким образом частично обходя указанный недостаток нейросетевой модели.

Основные типы задач, для решения которых чаще всего применяются искусственные нейронные сети, состоят в предсказании эволюции механически сложных физических систем, таких как: колония микроводорослей в сложной среде; переработка органического сырья [38]; работа со сложными химическими процессами [22]; классификация, распознавание, обработка изображений: фотографий, рукописного и печатного текста; кластеризация, аппроксимация, управление системами и принятие решений, и др. Наиболее широко используются многослойные перцептронные нейронные сети с прямым распространением сигнала и обратным распространением ошибки (Multi Layer Perceptron, MLP) [41]. Другим

популярным подвидом ИНС являются сверточные нейронные сети (Convolutional Neural Network, CNN), наиболее широко применяемые для работы с изображениями и звуком [31, 40]. В то время как обработка изображений достаточно высокого разрешения потребовала бы очень большого количества параметров, задающих поведение перцептронов в сети и всех связей между ними, в сверточных нейронных сетях делается предположение о незначительности расположения распознаваемых элементов в пространстве входных данных. Например, это касается лиц на изображении, что позволяет очень значительно сократить количество параметров за счет частичного связывания соседних слоев между собой, разбивая входные данные на участки, обрабатываемые только небольшим кластером нейронов [2]. После обработки полученные

на участках результаты сопоставляются на сверточном слое, предоставляя на выход единый результат.

Для преодоления недостатков искусственных нейронных сетей и расширения спектра задач, поддающихся эффективному решению этими методами, предпринимаются попытки доработать базовую архитектуру искусственных нейронных сетей: подключение дополнительной внешней памяти [18] или использование «размытой» работы с памятью, при которой операторы чтения и записи в той или иной мере затрагивают все элементы памяти [17]; попытки решения проблемы продолжительного обучения (continual learning) [23] (рис. 3); рассмотрение геометрической структуры данных [7]; использование нечеткой логики в связях между нейронами в сети (neuro-fuzzy network) [15].

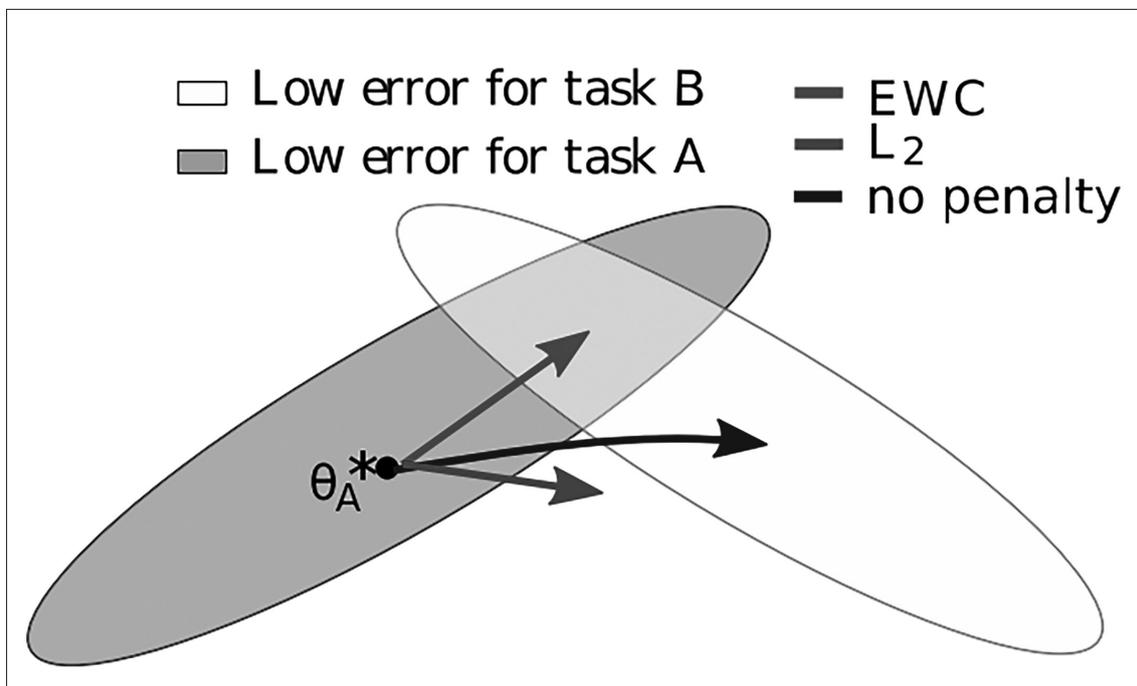


Рис. 3. Схема обучения с помощью EWC по сравнению с традиционными алгоритмами. *Примечание:* EWC — англ. сокращение «Elastic Weight Consolidation»: упругое (эластичное) закрепление весов

Применение ИНС в биологии

В области биотехнологий нейронные сети используются для решения задач предсказания и оптимизации процессов, таких как: культивация фототрофных микроорганизмов [10, 14–16, 25, 37], что рассмотрено подробно в соответствующем подразделе; производство биологически активных веществ [3, 33]; производство и переработка биомассы [13, 28, 32, 38]; моделирование белковых процессов [21], процессов разложения, использующих фотосинтетический кислород [20]; нахождение необходимых генов в геномах микроорганизмов [27].

Нейронные сети используются также для морфологического анализа микроорганизмов [41] и решения широкого спектра химических задач [22].

Искусственная нейронная сеть на основе программного пакета Matlab была применена для создания биопроцесса использования опавших иголок сосны вида *Pinus roxburghii* в создании биотоплива и фармацевтических продуктов путем извлечения из них полифенолов и восстанавливающих сахаров [38]. В связи с тем, что стоимость производства этанола из лигноцеллюлозных материалов остается высокой при текущем уровне развития технологий, процесс произ-

водства необходимо оптимизировать для уменьшения стоимости и повышения эффективности переработки. Оптимизация множества параметров получения восстанавливающих сахаров и полифенолов была проведена с помощью искусственной нейронной сети с 72 нейронами на входном и выходном слоях и 10 скрытыми слоями, обученной при помощи алгоритмов Левенберга — Марквардта. Это привело к заметному улучшению выхода производства, демонстрируя потенциал ИНС для использования подобных систем для оптимизации производства биотоплива второго поколения из дешевой и восполняемой лигноцеллюлозной биомассы. Также ИНС используются для дальнейшей работы с биотопливами — например, для предсказания характеристик биодизелей, полученных из различных типов биомасс, и оптимизации двигателей для работы с ними [32].

Использование искусственных нейронных сетей было предложено для решения задачи моделирования процесса производства липазы [21]. Задача дешевого, эффективного, точного и надежного моделирования таких процессов, как ферментация, представляет значительный интерес ввиду их широкого использования в химической, пищевой, фармацевтической и других индустриях, но плохо поддается решению традиционными методами из-за нелинейности биологических процессов и большого количества задействованных переменных. В качестве альтернативы классическому подходу были предложены следующие подходы — искусственные нейронные сети, нечеткая логика, генетические алгоритмы, дифференциальная эволюция и генетическое программирование. Для моделирования нелинейных процессов, зависящих от времени, была использована гибридная модель на основе ИНС и нечеткой логики. Генетические алгоритмы были использованы для оптимизации параметров нелинейной модели культуры гибридных клеток, дифференциальная эволюция — для решения проблемы ограниченной оптимизации процесса ферментации. Для предсказания концентраций продуктов реакций была применена модель, созданная с помощью генетико-экспрессивного программирования (gene-expression programming, GEP), являющегося расширением генетического программирования. Для сравнения с ИНС были задействованы полиномиальные модели. ИНС была обучена при помощи алгоритма с обратным распространением ошибки с оптимизацией по среднеквадратичному отклонению. Оптимальное количество нейронов на скрытом слое было определено экспериментально. Обученная таким образом ИНС по-

казала лучшие результаты, чем полиномиальная модель, из чего следует, что в процессе обучения ИНС смогла выстроить внутренние параметры в соответствии с нелинейными взаимоотношениями между различными входными данными.

В работе [41] было осуществлено сравнение эффективности различных типов искусственных нейронных сетей для морфологического анализа микроорганизмов по изображениям. Анализ микроорганизмов является важным направлением из-за их полезных применений, таких как удаление загрязнений из воды и использование в пищевой промышленности, и опасностей, представляемых микроорганизмами, способными вызывать болезни, часть из которых является смертельной. Из четырех существующих подходов к анализу микроорганизмов — физического, химического, методов молекулярной биологии и морфологического — последний является наименее дорогостоящим, но требует значительных временных затрат и ручного распознавания изображений. А это приводит к его ненадежности, так как результат может зависеть от таких человеческих факторов, как опыт, степень загрузки, усталости и настроения специалиста. В качестве альтернативы предлагается использование методов машинного обучения, хорошо показавших себя в решении различных задач распознавания и способных быстро извлекать необходимую информацию из предоставленных изображений. Одним из классов таких методов являются искусственные нейронные сети, и в данном исследовании был проведен анализ 96 ссылок по теме работы с изображениями микроводорослей. ИНС архитектуры MLP являются наиболее популярным классическим методом, в то время как сверточные нейронные сети (CNN) относятся к наиболее популярным методам глубинного обучения. В исследованиях с классическими нейронными сетями выделяющимися особенностями являются использование частных наборов данных, необходимость предварительной обработки и ручного выбора рассматриваемых характерных элементов для решения задач классификации, в то время как для прочих задач эти этапы не всегда обязательны и изображения могут напрямую передаваться ИНС. Особенности работы с ИНС глубинного обучения представляются отсутствием необходимости ручного выбора характерных элементов, использование наборов данных, находящихся в открытом доступе. Направление разработки более совершенных методов глубинного обучения выглядит более популярным по сравнению с классическими искусственными нейронными сетями.

Применение ИНС в работе с фототрофными микроорганизмами

Микроводоросли имеют множество областей применения: в медицине, пищевой промышленности и энергетике. Они способны накапливать биомассу значительно быстрее высших растений в худших условиях, не требуя наличия орошаемых земель и часто оставаясь нечувствительными к загрязнениям воды или даже используя загрязнения и пищевые отходы в качестве источника питательных веществ [34], что также позволяет использовать их для создания систем очистки воды [8]. Микроводоросли вырабатывают и накапливают широкий спектр биологически активных веществ (БАВ): белков, жирных кислот и витаминов, а также их можно использовать для производства красителей, масел и биотоплив [4, 9, 32, 36].

Задача оптимизации культивации микроводорослей представляет значительную трудность для классического решения путем создания алгоритмической модели, учитывающей все нелинейные взаимодействия множества компонентов сложной среды, в большинстве случаев необходимой для получения достаточного роста (их может быть несколько десятков) и их совместного влияния на метаболизм микроорганизмов из-за сложности такой системы и ее исследования [11, 16, 19, 24]. В качестве альтернативного подхода предлагается использование методов машинного обучения, что дает возможность пропустить этап создания алгоритмической модели и получить модель, позволяющую предсказывать поведение системы из экспериментальных данных. Для этого ставятся эксперименты по культивации нужного вида микроорганизмов в различных вариантах исследуемой среды, собираются данные об их росте в этих средах и из этих данных составляются базы для создания системы на основе методов машинного обучения, таких как искусственные нейронные сети [5, 10, 14–16, 25, 26, 37]. Чаще всего для решения таких задач используются искусственные нейронные сети с прямым распространением сигнала и обратным распространением ошибки (FBN, feed-forward back-propagation network).

В частности, искусственная нейронная сеть типа FBN была использована для решения задачи предсказания роста микроводорослей вида *Karlodinium veneficum* [16]. ИНС состояла из трех слоев с 27, 25 и 1 нейроном на входном, скрытом и выходном слоях соответственно и байесовской регуляризации в качестве обучающего алгоритма. Проблема переобучения сети была предотвращена путем ограничения оптимального количества нейронов

на скрытом слое. Для оценки работоспособности модели были использованы среднеквадратичная ошибка (mean squared error — MSE) и коэффициенты корреляции (R) на тренировочном и тестовом наборах данных. Нейросеть была обучена на более чем 420 пакетах экспериментальных данных для различных составов среды, изначально проводимых для задачи поиска оптимального состава среды для роста водорослей с помощью генетического алгоритма, и дополнительных данных для экстремальных вариантов среды, нормализованных для создания обучающих примеров для искусственной нейронной сети. Показанные с помощью этой модели хорошие результаты по предсказанию роста водорослей вида *K. veneficum* свидетельствуют о том, что искусственные нейронные сети могут быть успешно использованы для решения подобных задач, а также предсказания роста водорослей в естественной среде.

Было установлено, что задача моделирования взаимодействия компонентов среды при культивации микроводорослей — динофлагеллят вида *Protoceratium reticulatum*, используемых для производства ценных биоактивных элементов, — практически не может быть решена путем составления многомерной модели для представления совместного взаимодействия на основе клеточного ответа. В работе [37] отмечается, что исследования значимости макроэлементов среды для роста *P. reticulatum* проводились [30], но никакие существующие на момент написания работы [37] исследования по моделированию роста данного вида микроводорослей не включают в себя полное описание взаимодействия элементов среды. Так как ИНС особенно хорошо подходят для представления сильно нелинейных взаимодействий и с их помощью можно создать модель процесса независимо от типа взаимодействий, они были выбраны в качестве инструмента для предсказания роста данных микроводорослей в лабораторных условиях. В рамках задачи были протестированы следующие обучающие алгоритмы для сети с прямым распространением сигнала и обратным распространением ошибки из 26, 14 и 1 нейрона на входном, скрытом и выходном слоях соответственно: алгоритм Левенберга — Марквардта, байесовская регуляризация, квази-ньютоновский алгоритм, метод сопряженных градиентов, метод градиентного спуска, метод градиентного спуска с адаптивной скоростью обучения, метод градиентного спуска с инерцией, метод градиентного спуска с адаптивной скоростью обучения и инерцией. Обучение было проведено на данных из более чем 500 экспериментов, данные из которых были отмасштабированы необходимым образом для обучения в случае, когда масштабы различных входных компонент

заметно различаются. ИНС с одним скрытым слоем показала себя способной моделировать рост микроводорослей, что говорит о том, что подобные модели могут быть рекомендованы для представления нелинейных взаимодействий.

В работе [25] была создана система предсказания скорости роста смешанной культуры микроводорослей в открытом пруду на основе искусственной нейронной сети. Культивирование нативных смешанных культур открытым типом может быть эффективным методом производства биомассы даже в достаточно холодном климате, открывая перспективы для использования земель, не подходящих для традиционных сельскохозяйственных культур. В качестве входных параметров были использованы параметры среды, такие как содержание азотистых соединений, кислотность, содержание ацетата натрия, а также степень освещенности, температура и др.; ИНС содержала один скрытый слой из 11 искусственных нейронов. Полное количество экспериментальных данных составило 553 единицы. Обучение позволило получить значения R^2 до 0,95 для предсказания скорости роста биомассы, что свидетельствует о высокой эффективности модели. В исследовании [10] приводится еще один пример использования искусственных нейронных сетей для предсказания роста биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*. В качестве входных данных для ИНС конфигурации 23-20-1 выступали такие параметры культивирования, как степень освещенности, кислотность, температура и др., поддерживаемые на постоянном уровне в ходе культивирования, а также концентрации различных питательных веществ в среде. Всего были использованы 605 точек данных, выявленные при фотоавтотрофном культивировании микроводорослей в ходе четырех предшествующих исследований. По результатам обучения было получено значение R^2 , достигающее 0,98, а сравнительный анализ влияния входных параметров методом Гарсона продемонстрировал, что наиболее значительным фактором, влияющим на рост *C. vulgaris*, являлось количество CO_2 , поступающего в среду при аэрации.

В рамках исследования [14] ИНС были применены для определения состава смешанных культур микроводорослей. Традиционно задача отслеживания чистоты культуры решается при помощи изучения образцов культуры под микроскопом, с использованием биохимического анализа и иных вспомогательных методов в случаях, где различить микроорганизмы по морфологическим признакам затруднительно. Этот подход требует наличия хороших специалистов, а также значительных временных

и материальных затрат для получения достаточно хороших результатов. В качестве альтернативы предлагается обработка спектров поглощения при помощи искусственных нейронных сетей. Спектры поглощения способны идентифицировать чистые индивидуальные культуры, что в комбинации со способностью ИНС к обучению может позволить ИНС определить состав смешанной культуры по ее спектру. В качестве обучающих данных были использованы спектры, полученные при культивировании микроводорослей *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis* и цианобактерий *Nostoc sp.*, *Spirulina platensis* — заметно различающихся организмов, покрывающих довольно значительное разнообразие культур. Измерения были проведены как для чистых культур, так и для смесей двух культур в отношениях 1:1 и 3:1, полное число измерений составило 550. Искусственная нейронная сеть включала в себя 31 входной нейрон для различных частот в составе спектра, 45 нейронов на скрытом слое и 4 выходных нейрона, со связями между всеми нейронами на соседних слоях. По результатам тестирования ИНС показала хорошую точность определения чистых культур и смесей, близких к 1:1 по отношению составляющих элементов, но не была способна эффективно работать со смесями, содержащих 10–15% примесной культуры. Основными преимуществами данной системы является быстрота и автоматическая работа, а получение большего количества обучающих данных позволит повысить точность распознавания.

В работе [36] было предложено применять ИНС в качестве инструмента для изучения процессов пиролиза смесей микроводорослей *Chlorella vulgaris* и арахисовой скорлупы с использованием золы из микроводорослей в качестве катализатора. Ввиду уменьшения объема добычи и увеличения потребления ископаемых топлив, что предположительно продолжится до 2050 года, использование возобновляемой биомассы для производства биотоплива становится все более привлекательной альтернативой. К преимуществам такого подхода относятся возможности масштабного производства, биоразлагаемость, доступность, высокая концентрация горючих материалов и малое содержание золы. Из биомассы возможно производить такие полезные продукты, как биоуголь, сингаз и биомасла, при помощи термической конверсии. Одним из наиболее производимых типов биомассы является арахисовая скорлупа, объемом производства которой достиг 43,9 миллионов тонн в 2016 году. В большинстве случаев этот тип биомассы используется для производства активированного угля. Для анализа экспериментальных данных была выбрана

искусственная нейронная сеть, созданная при помощи MATLAB, не применявшаяся до момента написания указанной работы в контексте биотоплив третьего поколения. В качестве входных параметров были выбраны скорость нагрева и температура при обработке смеси, а в качестве выходного параметра — процент потери веса после обработки. Структура используемой ИНС включала в себя два скрытых слоя с количеством нейронов от 2 до 12 и различными комбинациями tansig и logsig из инструментария MATLAB в качестве активаторных функций. Наилучшие результаты были достигнуты с 9 нейронами на скрытых слоях для комбинации tansig-tansig и с 11 нейронами для комбинации logsig-tansig , со значениями среднеквадратичной ошибки 0,00236 и 0,00498 соответственно, в то время как остальные комбинации показали результаты значительно хуже. Дальнейшее изучение результатов выявило, что комбинация logsig-tansig позволяет получить наибольшие значения R^2 . Результаты демонстрируют работоспособность системы, и дальнейшие исследования с применением золы микроводорослей в качестве катализатора дадут возможность добыть больше информации об экономической целесообразности использования такого подхода.

ИНС были выбраны в качестве математического метода описания и предсказания работы системы третичной очистки воды на основе микроводорослей [8]. Рост населения и уровня индустриализации приводит к увеличению количества загрязнений, что негативно сказывается на качестве существующих водных ресурсов. Больше всего проблем с качеством и количеством доступных водных ресурсов испытывает северная Африка и ближневосточные регионы [1]. Соответственно возникает необходимость создания новых и доработки существующих систем очистки сточных вод. Для третичного этапа очистки — от высокого содержания соединений азота и фосфора — традиционно используются дорогостоящие физико-химические методы, в качестве альтернативы которым предлагается использование систем на основе микроводорослей, способных не только поглощать загрязнения из воды, но и использовать их для роста биомассы, имеющей множество применений. Предварительные исследования установили способность микроводорослей удалять до 90% азотных и фосфорных загрязнений за 10 дней культивирования при низкой стоимости по сравнению с традиционными методами. Однако значительным препятствием на пути применения нового метода на практике является задача предсказания и обеспечения правильной работы широкомасштабных

систем на основе микроводорослей, и для решения этой задачи предлагается использование ИНС. Для разработки ИНС был использован Scilab 6.0.1 с пакетом Neural Network Module 2.0, для обучения была использована 221 точка данных. Наилучший результат, с R^2 по удалению фосфатов и ионов аммония превышающим 0,95, был получен на архитектуре, содержащей 4, 7 и 2 нейрона на входном, скрытом и выходном слоях соответственно. ИНС показали себя хорошим инструментом для решения данной задачи.

Использование ИНС для предсказания биоадсорбции микроводорослями красителя метиленового синего предлагается в работе [3]. Этот краситель не является сильно токсичным, но тем не менее способен вызывать проблемы со здоровьем и содержится в больших объемах в отходах текстильной, косметической, бумажной и прочих индустрий. Традиционные методы удаления красителя при помощи окисления, коагуляции или мембран требуют дорогостоящего оборудования и высоких затрат на работу. В качестве альтернативы предлагается биоадсорбция, основным механизмом обеспечения которой служат свойства клеточных мембран и их способности к взаимодействию с загрязнениями, предположительно электростатической природы, и преимущества которой включают в себя высокую селективность и значительную эффективность удаления загрязнений. В рассматриваемой работе в качестве используемого микроорганизма были выбраны цианобактерии *Spirulina sp.* Ввиду сложности моделирования равновесных процессов адсорбции из-за наличия сложных взаимодействий между различными переменными, участвующими в процессе, в качестве инструмента моделирования предлагается использовать ИНС. Биомасса для проведения экспериментов культивировалась в среде BG-11, затем сушилась при 60 градусах Цельсия в течение 30 часов. Затем сухая биомасса добавлялась в раствор 9,67 мг/л красителя метиленового синего, и полученная суспензия перемешивалась в течение двух часов. После удаления биомассы количество метиленового синего в очищенном растворе определялось при помощи измерения спектрофотометром на длине волны 652 нм. Для обработки полученных данных были протестированы ИНС двух архитектур: с алгоритмом имитации отжига и с генетическим алгоритмом, с двумя скрытыми слоями и использованием сигмоидной функции в качестве активаторной в обоих случаях. ИНС использовали три входных параметра: количество биомассы, температуру и кислотность среды, а в качестве выходного параметра выступали предсказание

эффективности очистки или способность к биоадсорбции. По результатам обучения, оба типа архитектуры показали сходные результаты при количестве нейронов на скрытых слоях от 4 до 12, в то время как ИНС с использованием генетического алгоритма с 16 и 22 нейронами на скрытых слоях достигли меньших значений среднеквадратичной ошибки предсказания — 0,11 и 0,03, соответственно. Это было сравнено с ИНС с использованием алгоритма имитации отжига с теми же количествами нейронов на скрытых слоях, которые достигли значений среднеквадратичных ошибок в 1,28 и 0,11, соответственно. Таким образом, было установлено, что модели на основе искусственных нейронных сетей позволяют достичь более точного предсказания эффективности биоадсорбции по сравнению с изотермическими моделями Ленгмюра, Фрейндлиха и др.

Также микроводоросли могут использоваться в качестве индикатора присутствия загрязнений из-за быстрых изменений типов и концентрации различных культур в ответ на изменения концентрации различных веществ, но эффективное распознавание микроводорослей и оценка концентраций являются трудозатратной и подверженной с большой вероятностью ошибок процедурой из-за микроскопических размеров и большого количества видов. В качестве альтернативы в работе [29] предлагается использование алгоритмов машинного обучения, хорошо показавших себя в качестве инструментов решения различных задач распознавания. Архитектура системы классификации Faster R-CNN была дополнена дополнительной ветвью, позволяя достичь многозадачного обучения, причем ветви 1, 2 и 3 отвечают за определение рода, месторасположения и класса микроводорослей, соответственно. Набор данных, используемый для обучения, содержал 1859 микроскопических изображений высокого разрешения, включающих в себя 37 различных видов микроводорослей 6 различных классов, представленных в различных ориентациях и взаиморасположениях. Кроме микроводорослей, в изображениях также присутствовал шум в виде других объектов, не подлежащих распознаванию классификатором, таким как бактерии. По результатам обучения были достигнуты значения вероятности верного обнаружения в 74,64% для рода и 81,17% для класса микроводорослей, в то время как для задач непосредственно классификации были достигнуты значения в 96,5% и 99,1%, соответственно. Большая часть ошибок обнаружения относилась к почти прозрачным организмам, а ошибок классификации — к родам и классам, составившим менее 1% от объема обучающих данных.

Применение ИНС в производстве фикоцианина

Цианобактерии, как и красные водоросли и криптозомады, способны синтезировать различные фикобилепротейны (PBP), которые можно разделить на три основных класса: фикоэритрин (PE), фикоцианин (PC) и аллофикоцианин (APC) в зависимости от спектральных свойств. Фикобилепротейны получают из таких микроорганизмов, как *Spirulina spp.*, *Synechococcus sp.*, *Oscillatoria sp.* и др., а для коммерческого производства используются *Spirulina platensis*, *Anabaena sp.* и *Galdieria sulphuraria*. Цианобактерии обладают большими способностями к адаптации к условиям окружающей среды, что может привести к изменению как количества, так и специфических функций фикобилепротейнов в клетках в зависимости от таких параметров, как наличие и количество питательных веществ, интенсивность и тип освещения. Обеспечение приспособляемости к этому является одной из основных функций фикобилепротейнов в клетке, температуры и др. [6]. Фикобилепротейны широко используются как красители для пищи, косметики, а также имеют ряд фармацевтических применений [9, 12, 35].

Использование различных существующих динамических моделей для оптимизации культивирования микроводорослей и производства фикоцианина дает возможность улучшать производительность систем как в лабораторных, так и в коммерческих условиях, но в большинстве случаев эти модели работают с весьма ограниченным набором параметров и не могут использоваться для создания новых процессов. Это обсуждается в работе [11], где создается подобная динамическая модель для оптимизации крупномасштабного культивирования в открытых прудах. Заостряется внимание на необходимости создания динамических моделей, способных предсказывать поведение биологической системы, учитывая влияние таких немаловажных факторов, как интенсивность освещения и присутствие питательных веществ. Целью данной работы является создание модели для цианобактерий *Arthrospira platensis* на основе моделей Monod и Droop, с учетом концентрации питательных веществ, интенсивности освещения и степени проникновения света в толщу растущей культуры. В то время как температура также является фактором, в значительной мере влияющим на продукцию фикоцианина, предыдущие исследования показали, что оптимальным является узкий промежуток между 25 и 30 °C, и поэтому в обсуждаемом исследовании была использована температура 28 °C. В ходе экспериментов было найдено, что для роста клеток и синтеза фикоцианина являются оптимальными

различные интенсивности освещения, 282 и 137 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ соответственно, а также было продемонстрировано негативное влияние высоких концентраций нитратов на синтез фикоцианина. Составленные модели обнаружили хорошую точность, исключая позднюю стационарную фазу, предположительно из-за того, что освещение было слишком низким для активации фотосинтеза, что выходит за пределы эффективного функционирования модели Aiba. С помощью таких моделей были получены обоснования для ранее наблюдаемых экспериментальных фактов. При достижении значительной концентрации биомассы (около 50 часов роста) поглощение света становится достаточно интенсивным для того, чтобы скорость роста цианобактерий в центре растущей культуры падала практически до нуля, в то время как вблизи внешней поверхности фотобиореактора наблюдался экспоненциальный рост. В то же время синтез фикоцианина, оптимальными для которого являются значительно более низкие значения интенсивности освещения, падает вблизи внешней поверхности, где клеткам не нужно высокое его содержание. Однако синтез поднимается в толще растущей культуры, пока не будет достигнута интенсивность поглощения, ограничивающая способность к фотосинтезу настолько, что клетки начинают перерабатывать фикоцианин в другие азотозапасующие вещества (около 200 часов). При перемешивании культуры клетки, попадая из толщи на поверхность, начинают поглощать накопленный фикоцианин. Добавление нитратов может оказывать как положительный, так и отрицательный эффекты на полное количество фикоцианина из-за ускоренного роста биомассы, приводящего к более значительному поглощению света; оптимальными являются сравнительно невысокие значения содержания нитратов в среде. Данные модели могут быть доработаны для включения дополнительных факторов, таких как содержание фосфора в среде, но их применение в крупномасштабном производстве может быть затруднено из-за необходимости учета динамики перемешивания культуры.

В работе [12] были изучены возможности оптимизации процесса синтеза фикоцианина-С цианобактериями *Arthrospira platensis* при помощи искусственных нейронных сетей. Одним из главных недостатков искусственных нейронных сетей являются требования больших объемов данных для обучения. Для преодоления этого недостатка для обучения искусственной нейронной сети при помощи ранее сконструированной модели были сгенерированы наборы обучающих данных, в которые для создания вариативности были искусственно внесены шумы различных величин, а также были проведены три

эксперимента с различными значениями содержания нитратов в среде для проверки работы модели. Было показано, что как слишком большие, так и слишком малые значения вносимой ошибки не позволяют улучшить производительность нейронной сети, в то время как внесение ошибки с оптимальной величиной около 3% позволяет улучшить производительность нейронной сети только за счет математической обработки имеющихся данных без необходимости получения новых. На основе полученных данных была проведена оптимизация условий для 12-дневного процесса культивирования и получен прирост синтеза фикоцианина-С в 85,6%, что говорит о высокой эффективности нейросетевой стратегии оптимизации. Системы на основе ИНС также использовались для исследования роста микроводорослей *Spirulina platensis* в работе [28], в которой микроводоросли выращивались в условиях открытого пруда. Отсутствие возможности контролировать такие условия, как интенсивность освещения, температура и количество растворенного кислорода, значительно усложняет культивирование открытым методом, но преодоление этих недостатков позволит значительно увеличить масштабы производства. Применение ИНС дало возможность добыть достаточно хорошие результаты, используя для обучения данные, полученные за 12 суток роста культуры. Исследование эффективности обучения ИНС на данных о более кратком периоде культивирования при прочих равных условиях выявило, что каждые дополнительные трое суток приводят к линейному росту R^2 до достижения 12 суток, после чего значительных улучшений точности не наблюдается. Минимальное количество данных, необходимых для обучения, служит важным параметром для создания систем управления, определяя скорость их реакции на изменения, происходящие в системе.

В исследовании [5] разрабатывалась система непрерывного наблюдения за ростом культуры с использованием ИНС для контроля параметров среды. Правильное определение времени сбора культуры представляет собой одну из главных задач оптимизации культивирования, и создание полностью автоматической системы наблюдения позволило бы существенно уменьшить трудозатраты при непрерывном промышленном культивировании микроводорослей, спрос на которые заметно превосходит предложение в настоящий момент и продолжает расти. Разработанная система контроля имеет датчики температуры, кислотности и содержания растворенного кислорода. Поддержание температуры в пределах от 29 до 32 °C обеспечивается при помощи нагревательного элемента и вентилятора, в то время

как кислотность контролируется добавлением в среду углекислого газа и гидроксида натрия. ИНС измеряет плотность клеток в культуре на основе значений RGB и освещенности. ИНС содержит один скрытый слой из 24 искусственных нейронов и обучена на 300 примерах, достигая среднеквадратичной ошибки определения плотности в 0,0047813. Система показала себя значительно более эффективной по сравнению с традиционным методом культивирования без контроля параметров среды, позволяя добиться увеличения скорости роста на 39,52%.

Заключение

Искусственные нейронные сети, а также вероятностные нейронные сети являются хорошо показавшими себя инструментами для решения многих задач биологии и смежных областей. В задачах, где требуется работа со сложными системами, плохо поддающимися алгоритмическому описанию, архитектура нейросетевых алгоритмов позволяет им достигать значительно лучших результатов, чем традиционные алгоритмы обработки данных. В то же время вероятностные нейронные сети способны эффективно решать задачи распознавания. Использование искусственных нейронных сетей дает возможность добиться существенных результатов в решении различных задач, возникающих при культивировании микроводорослей, а также для получения БАВ.

Работа выполнена в рамках тематического плана НИОКР на 2021 год «Фундаментальные междисциплинарные исследования в nano-, био-, инфо- и когнитивных технологиях» по п. 1.12. «Разработка научно-технических основ для создания автономных систем жизнеобеспечения для использования в условиях Крайнего Севера, Арктики и космоса».

Литература

1. Abdel-Raouf N., Al-Homaidan A.A., and Ibraheem I.B.M. Microalgae and wastewater treatment // Saudi J. Biol. Sci. — 2012. — Vol. 19. — No. 3. — P. 257–275.
2. Albawi S. and Mohammed T.A. Understanding of a convolutional neural network / In International Conference on Engineering and Technology (ICET), 2017.
3. Alcalá M.M. and Pe R. Artificial Neural Network for predicting biosorption of methylene blue by *Spirulina* sp. // Water Sci. Technol. — 2011. — Vol. 63(5). — P. 977–983.
4. Ananyev G., Carrieri D., and Dismukes G.C. Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium «*Arthrospira (Spirulina) maxima*» // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — Vol. 74. — No. 19. — P. 6102–6113.
5. Aquino A.U., Bautista M.V.L., Diaz C.H., Valenzuela I.C., and Dadios E.P. A vision-based closed *Spirulina* (*A. platensis*) cultivation system with growth monitoring using artificial neural network / In IEEE 10th International Conference on Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment and Management (HNICEM), 2018 November. doi: 10.1109/HNICEM.2018.8666367.
6. Boussiba S. and Richmond A.E. C-phycoerythrin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis* // Arch. Microbiol. — 1980. — Vol. 147. — P. 143–147.
7. Brahma P.P., Wu D., and She Y. Why deep learning works: A manifold disentanglement perspective // IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems. — 2015. — Vol. 27(10). — P. 1–12. doi: 10.1109/TNNLS.2015.2496947.
8. Carvalho Y.O., Oliveira W.V., Pagano R.L., and Silva C.F. Application of artificial neural networks in the tertiary treatment of liquid effluent with microalgae *Chlorella vulgaris* // Chem. Eng. Technol. — 2021. — Vol. 44. — Issue 10. — P. 1863–1869.
9. Chakdar H. and Pabbi S. Cyanobacterial phycobilins: Production, purification, and regulation / In Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology. — 2016. — P. 45–69.
10. Chamilka V. et al. Development of an artificial neural network model to simulate the growth of microalga *Chlorella vulgaris* incorporating the effect of micronutrients // J. Biotechnol. — 2020. — Vol. 312. — P. 44–55.
11. del Rio-Chanona del E.A., Zhang D., Xie Y., Manirafasha E., and Jing K. Dynamic simulation and optimization for *Arthrospira platensis* growth and C-phycoerythrin production // Ind. Eng. Chem. Res. — 2015. — Vol. 54. — No. 43. — P. 10606–10614.
12. del Rio-Chanona E.A., Manirafasha E., Zhang D., Yue Q., and Jing K. Dynamic modeling and optimization of cyanobacterial C-phycoerythrin production process by artificial neural network // Algal Res. — 2016. — Vol. 13. — P. 7–15.
13. Fernando A.H., Mag A.B., and Ubando A.T. Optimization of an algae ball mill grinder using artificial neural network / In IEEE Region 10 Conference (TENCON), 2016. — P. 3752–3756.
14. Franco B.M., Navas L.M., Gómez C., Sepúlveda C., and Acién F.G. Monoalgal and mixed algal cultures discrimination by using an artificial neural network // Algal Res. — 2019. — Vol. 38. — P. 101419.
15. Furlong V.B. et al. Estimating microalgae *Synechococcus nidulans* daily biomass concentration using neuro-fuzzy network // Food Sci. Technol. — 2013. — Vol. 33(suppl 1). doi: 10.1590/S0101-20612013000500021.

16. *García-Camacho F., López-Rosales L., Sánchez-Mirón A., Belarbi E.H., Chisti Y., and Molina-Grima E.* Artificial neural network modeling for predicting the growth of the microalga *Karodinium veneficum* // *Algal Res.* — 2016. — Vol. 14. — P. 58–64.
17. *Graves A., Wayne G., Danihelka I.* Neural Turing machines // Published 20 October 2014. Computer Science. ArXiv. Corpus ID: 152299054.
18. *Graves A. et al.* Hybrid computing using a neural network with dynamic external memory // *Nature.* — 2016 October. — Vol. 538(7626). doi: 10.1038/nature20101.
19. *Grobbelaar J.U.* Microalgal biomass production: challenges and realities // *Photosynth. Res.* — 2010. — Vol. 106. — No. 1–2. — P. 135–144.
20. *Guieysse B. and Mu R.* Modeling photosynthetically oxygenated biodegradation processes using artificial neural networks // *J. Hazard. Mater.* — 2008. — Vol. 155. — P. 51–57.
21. *Hiary R. and Sheta A.F.* Modeling lipase production process using artificial neural networks. Conference: Multimedia Computing and Systems (ICMCS), 2012 International Conference on. — 2012 May. — Conference Paper. PDF Available. doi: 10.1109/ICMCS.2012.6320191.
22. *Himmelblau D.M.* Accounts of experiences in the application of artificial neural networks in chemical engineering // *Ind. Eng. Chem. Res.* — 2008. — Vol. 47(16). — P. 5782–5796.
23. *Kirkpatrick J., Pascanu R., Rabinowitz N., Veness J., Desjardins G., and Rusu A.A. et al.* Overcoming catastrophic forgetting in neural networks // *Computer Science.* — 2017. — Vol. 114(13). — P. 3521–3526.
24. *Manirafasha E., Murwanashyaka T., Ahmed N.R., Liu J., Lu Y., and Zeng X.* Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch // *Bioresour. Technol.* — 2017. — Vol. 255. — P. 293–301. doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.068.
25. *Noguchi R. et al.* Artificial neural networks model for estimating growth of polyculture microalgae in an open raceway pond // *Biosyst. Eng.* — 2019. — Vol. 177. — P. 122–129.
26. *Ortellado B.M.F.* Applications of artificial neural networks in three agro-environmental systems: microalgae production, nutritional characterization of soils and meteorological variables management: diss. — Universidad de Valladolid, 2019. Corpus ID: 213402497. doi: 10.35376/10324/39419.
27. *Palaniappan K. and Mukherjee S.* Predicting «Essential» genes across microbial genomes: A machine learning approach / In 10th International Conference on Machine Learning and Applications and Workshops, 2011, — P. 189–194. doi: 10.1109/ICMLA.2011.114.
28. *Pappu J.S.M., Vijayakumar G.K., and Ramamurthy V.* Artificial neural network model for predicting production of *Spirulina platensis* in outdoor culture // *Bioresour. Technol.* — 2013. — Vol. 130. — P. 224–230.
29. *Qian P., Zhao Z., Liu H., Wang Y., Peng Y., Hu S., Zhang J., Deng Y., Zeng Z.* Multi-target deep learning for algal detection and classification // Published 2020 May. Corpus ID: 218537925. doi: 10.1109/EMBC44109.2020.9176204.
30. *Rodríguez J.J.G. et al.* Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* // *Harmful Algae.* — 2009. — Vol. 8. — P. 239–246.
31. *Sainath T.N., Mohamed A., Kingsbury B., and Ramabhadran B.* Deep convolutional neural networks for LVCSR / In IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing, 2013. — P. 8614–8618.
32. *Salam S. and Verma T.N.* Appending empirical modelling to numerical solution for behaviour characterisation of microalgae biodiesel // *Energy Convers. Manag.* — 2019. — Vol. 180. — P. 496–510.
33. *Sivapathasekaran C., Mukherjee S., Ray A., Gupta A., and Sen R.* Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant // *Bioresour. Technol.* — 2010. — Vol. 101. — No. 8. — P. 2884–2887.
34. *Sloth J.K., Jensen H.C., Pleissner D., and N. Thomas N.* Growth and phycocyanin synthesis in the heterotrophic microalga *Galdieria sulphuraria* on substrates made of food waste from restaurants and bakeries // *Bioresour. Technol.* — 2017. — Vol. 238. — P. 296–305. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.043.
35. *Susanna D., Dhanapal R., and Mahalingam R.* Increasing productivity of *Spirulina platensis* in photobioreactors using artificial neural network modeling // *Biotechnol. Bioeng.* — 2019. — Vol. 116(11). — P. 2960–2970.
36. *Tyng J. et al.* Artificial neural network approach for co-pyrolysis of *Chlorella vulgaris* and peanut shell binary mixtures using microalgae ash catalyst // *Energy.* — 2020. — Vol. 207(9). — Art. 118289. doi: 10.1016/j.energy.2020.118289.
37. *Vats S. and Negi S.* Modelling of multi-nutrient interactions in growth of the dinoflagellate microalga *Protoceratium reticulatum* using artificial neural networks // *Bioresour. Technol.* — 2013. — Vol. 146. — P. 682–688.
38. *Vats S. and Negi S.* Use of artificial neural network (ANN) for the development of bioprocess using *Pinus roxburghii* fallen foliages for the release of polyphenols and reducing sugars // *Bioresour. Technol.* — 2013. — Vol. 140. — P. 392–398.
39. *Xie J., Dai G., Zhu F., Shao L., and Fang Y.* Deep nonlinear metric learning for 3-D shape retrieval // *IEEE Trans. Cybern.* — 2016. — Vol. 48. — No. 1. — P. 412–422.
40. *Yamashita R., Nishio M., Kinoshita R., Do G., and Togashi K.* Convolutional neural networks: an overview and application in radiology // *Insights Imaging.* — 2018. — Vol. 9. — P. 611–629.
41. *Zhang J., Li C., and Grzegorzec M.* Applications of artificial neural networks in microorganism image analysis: A comprehensive review from conventional multilayer perceptron

to popular convolutional neural network and potential visual transformer. Preprint. — 2021 July.

References

- Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, and Ibraheem IBM. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J Biol Sci* 2012; 19(3):257–275.
- Albawi S and Mohammed TA. Understanding of a convolutional neural network. In *International Conference on Engineering and Technology (ICET)*, 2017.
- Alcala MM and Pe R. Artificial Neural Network for predicting biosorption of methylene blue by *Spirulina* sp. *Water Sci Technol* 2011; 63(5):977–983.
- Ananyev G, Carrieri D, and Dismukes GC. Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen production by the cyanobacterium «*Arthrospira (Spirulina) maxima*». *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(19):6102–6113.
- Aquino AU, Bautista MVL, Diaz CH, Valenzuela IC, and Dadios EP. A vision-based closed *Spirulina (A. platensis)* cultivation system with growth monitoring using artificial neural network. In *IEEE 10th International Conference on Humanoid, Nanotechnology, Information Technology, Communication and Control, Environment and Management (HNICEM)*, 2018 November. doi: 10.1109/HNICEM.2018.8666367.
- Boussiba S and Richmond AE. C-phycoyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch Microbiol* 1980; 147:143–147.
- Brahma PP, Wu D, and She Y. Why deep learning works: A manifold disentanglement perspective. *IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems* 2015; 27(10):1–12. doi: 10.1109/TNNLS.2015.2496947.
- Carvalho YO, Oliveira WV, Pagano RL, and Silva CF. Application of artificial neural networks in the tertiary treatment of liquid effluent with microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chem Eng Technol* 2021; 44. — Issue 10:1863–1869.
- Chakdar H and Pabbi S. Cyanobacterial phycobilins: Production, purification, and regulation. In *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology* 2016:45–69.
- Chamilka V et al. Development of an artificial neural network model to simulate the growth of microalga *Chlorella vulgaris* incorporating the effect of micronutrients. *J Biotechnol* 2020; 312:44–55.
- del Rio-Chanona del EA, Zhang D, Xie Y, Manirafasha E, and Jing K. Dynamic simulation and optimization for *Arthrospira platensis* growth and C-phycoyanin production. *Ind Eng Chem Res* 2015; 54(43):10606–10614.
- del Rio-Chanona EA, Manirafasha E, Zhang D, Yue Q, and Jing K. Dynamic modeling and optimization of cyanobacterial C-phycoyanin production process by artificial neural network. *Algal Res* 2016; 13:7–15.
- Fernando AH, Mag AB, and Ubando AT. Optimization of an algae ball mill grinder using artificial neural network. In *IEEE Region 10 Conference (TENCON)*, 2016:3752–3756.
- Franco BM, Navas LM, Gómez C, Sepúlveda C, and Acién FG. Monoalgal and mixed algal cultures discrimination by using an artificial neural network. *Algal Res* 2019; 38:101419.
- Furlong VB et al. Estimating microalgae *Synechococcus nidulans* daily biomass concentration using neuro-fuzzy network. *Food Sci Technol* 2013; 33(suppl 1). doi: 10.1590/S0101-20612013000500021.
- García-Camacho F, López-Rosales L, Sánchez-Mirón A, Belarbi EH, Chisti Y, and Molina-Grima E. Artificial neural network modeling for predicting the growth of the microalga *Karodinium veneficum*. *Algal Res* 2016; 14:58–64.
- Graves A, Wayne G, Danihelka I. Neural Turing machines. Published 20 October 2014. *Computer Science. ArXiv. Corpus ID: 152299054*.
- Graves A et al. Hybrid computing using a neural network with dynamic external memory. *Nature* 2016; 538(7626). doi: 10.1038/nature20101.
- Grobbelaar JU. Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynth Res* 2010; 106(1–2):135–144.
- Guieysse B and Mu R. Modeling photosynthetically oxygenated biodegradation processes using artificial neural networks. *J Hazard Mater* 2008; 155:51–57.
- Hiary R and Sheta AF. Modeling lipase production process using artificial neural networks. *Conference: Multimedia Computing and Systems (ICMCS), 2012 International Conference on 2012; Conference Paper. PDF Available. doi: 10.1109/ICMCS.2012.6320191*.
- Himmelblau DM. Accounts of experiences in the application of artificial neural networks in chemical engineering. *Ind Eng Chem Res* 2008; 47(16):5782–5796.
- Kirkpatrick J, Pascanu R, Rabinowitz N, Veness J, Desjardins G, and Rusu AA et al. Overcoming catastrophic forgetting in neural networks. *Computer Science* 2017; 114(13):3521–3526.
- Manirafasha E, Murwanashyaka T, Ahmed NR, Liu J, Lu Y, and Zeng X. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresour Technol* 2017; 255:293–301. doi: 10.1016/j.biortech.2017.12.068.
- Noguchi R et al. Artificial neural networks model for estimating growth of polyculture microalgae in an open raceway pond. *Biosyst Eng* 2019; 177:122–129.
- Ortellado BMF. Applications of artificial neural networks in three agro-environmental systems: microalgae production, nutritional characterization of soils and meteorological variables management: diss. Universidad de Valladolid, 2019. *Corpus ID: 213402497. doi: 10.35376/10324/39419*.

27. Palaniappan K and Mukherjee S. Predicting «Essential» genes across microbial genomes: A machine learning approach. In 10th International Conference on Machine Learning and Applications and Workshops, 2011:189–194. doi: 10.1109/ICMLA.2011.114.
28. Pappu JSM, Vijayakumar GK, and Ramamurthy V. Artificial neural network model for predicting production of *Spirulina platensis* in outdoor culture. *Bioresour Technol* 2013; 130:224–230.
29. Qian P, Zhao Z, Liu H, Wang Y, Peng Y, Hu S, Zhang J, Deng Y, Zeng Z. Multi-target deep learning for algal detection and classification. Published 2020 May. Corpus ID: 218537925. doi: 10.1109/EMBC44109.2020.9176204.
30. Rodríguez JJG. et al. Macronutrients requirements of the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 2009; 8:239–246.
31. Sainath TN, Mohamed A, Kingsbury B, and Ramabhadran B. Deep convolutional neural networks for LVCSR. In IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing, 2013:8614–8618.
32. Salam S and Verma TN. Appending empirical modelling to numerical solution for behaviour characterisation of microalgae biodiesel. *Energy Convers. Manag* 2019; 180:496–510.
33. Sivapathasekaran C, Mukherjee S, Ray A, Gupta A, and Sen R. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. *Bioresour Technol* 2010; 101(8):2884–2887.
34. Sloth JK, Jensen HC, Pleissner D, and N Thomas N. Growth and phycocyanin synthesis in the heterotrophic microalga *Galdieria sulphuraria* on substrates made of food waste from restaurants and bakeries. *Bioresour Technol* 2017; 238:296–305. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.043.
35. Susanna D, Dhanapal R, and Mahalingam R. Increasing productivity of *Spirulina platensis* in photobioreactors using artificial neural network modeling. *Biotechnol Bioeng* 2019; 116(11):2960–2970.
36. Tyng J et al. Artificial neural network approach for co-pyrolysis of *Chlorella vulgaris* and peanut shell binary mixtures using microalgae ash catalyst. *Energy* 2020; 207(9):118289. doi: 10.1016/j.energy.2020.118289.
37. Vats S and Negi S. Modelling of multi-nutrient interactions in growth of the dinoflagellate microalga *Protoceratium reticulatum* using artificial neural networks. *Bioresour Technol* 2013; 146:682–688.
38. Vats S and Negi S. Use of artificial neural network (ANN) for the development of bioprocess using *Pinus roxburghii* fallen foliages for the release of polyphenols and reducing sugars. *Bioresour Technol* 2013; 140:392–398.
39. Xie J, Dai G, Zhu F, Shao L, and Fang Y. Deep nonlinear metric learning for 3-D shape retrieval. *IEEE Trans Cybern* 2016; 48(1):412–422.
40. Yamashita R, Nishio M, Kih R, Do G, and Togashi K. Convolutional neural networks: an overview and application in radiology. *Insights Imaging* 2018; 9:611–629.
41. Zhang J, Li C, and Grzegorzec M. Applications of artificial neural networks in microorganism image analysis: A comprehensive review from conventional multilayer perceptron to popular convolutional neural network and potential visual transformer. Preprint July 2021.

MODERN TRENDS IN THE USE OF NEURAL NETWORK ALGORITHMS IN BIOTECHNOLOGY OF PHOTOTROPHIC MICROORGANISMS

P.S. NAZIN, K.V. GORIN, P.M. GOTOVTSEV, R.G. VASILOV

Scientific Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

The authors provide an overview of data on artificial neural networks (ANNs), including multilayer perceptronic ANNs with backpropagation of errors, ANNs with deep learning, and convolutional ANNs. They also considered modern developments: to improve the performance of ANNs, to overcome various disadvantages that arise in their practical application, to the success of using various types of ANNs in different fields of biology, microbiology, medicine and related disciplines. Attention is drawn to the possibility of using ANN to work with phototrophic microorganisms.

Keywords: artificial neural networks, neural network algorithms, biotechnology, phototrophic microorganisms, cyanobacteria, phycocyanin.

Address:

Nazin P.S.

postgraduate student, National Research Centre «Kurchatov Institute»

E-mail: NazinPSwork@gmail.com

Для цитирования:

Назин П.С., Горин К.В., Готовцев П.М., Василов Р.Г. Современные тенденции в применении нейросетевых алгоритмов в биотехнологии фототрофных микроорганизмов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(4):65–78.

For citation:

Nazin P.S., Gorin K.V., Gotovtsev P.M., Vasilov R.G. Modern trends in the use of neural network algorithms in biotechnology of phototrophic microorganisms. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(4):65–78 (in Russian).

1. *Предметная область.* Принимаются оригинальные и обзорные научные работы по теории, методологии и практике биотехнологии и сопряженных дисциплин: физико-химическая (молекулярная) биология, генная инженерия, геномные и постгеномные технологии, биохимия, биофизика, биоинформатика, микробиология и др.
2. *Общие положения.* Рукописи оформляются в соответствии с общепринятыми требованиями, предъявляемыми к научному исследованию в отношении авторских прав, преемственности, обоснованности целеполагания, достоверности, доказательности, орфографической и стилистической корректности и т.д. В статье должны быть четко обозначены актуальность, научная значимость, методология, цель исследования, результаты и выводы, а также исчерпывающий анализ литературы.
3. Статьи принимаются на русском и английском языках.
4. Объем статьи не должен превышать от 14 до 26 страниц.
5. Оригинальность текста должна составлять не менее 80% (статьи проходят проверку по системе «Антиплагиат»).
6. Для набора текста, формул и таблиц необходимо использовать редактор Microsoft Word для Windows. Параметры текстового редактора: все поля по 2 см; шрифт Times New Roman, размер — 12; межстрочный интервал — 1,5; выравнивание по ширине; абзацный отступ — 1 см; ориентация листа — книжная.
7. Все визуальные объекты должны быть предоставлены в формате, допускающем форматирование. Все файлы рисунков должны быть пронумерованы, а названия рисунков должны быть приведены в конце статьи (например: Рисунок 1. Название рисунка). Любые рисунки (в том числе графики и диаграммы) должны быть информативными как в цветном, так и черно-белом исполнении. Иллюстрации прилагаются в электронном виде в формате JPEG или TIF.
8. Таблицы размещаются в самой статье. Ниже таблицы нужно дать номер таблицы и название (например: Таблица 3. Название таблицы).
9. Оформление мета-данных статьи: 1. Полное название статьи. 2. Укороченный вариант названия статьи (Running title). 3. Ф.И.О. автора статьи. 4. Ученое звание, ученая степень, должность. 5. Место работы: кафедра, факультет, название вуза. 6. Город, страна. 7. Рабочий адрес с почтовым индексом, рабочий телефон. 8. E-mail. 9. Информация о гранте (если есть).
 - Если авторов статьи несколько, то информация повторяется для каждого автора.
 - Возможно при желании сопроводить статью кратким биографическим описанием автора как исследователя (не более 50 слов на английском языке, не более 60 слов на русском языке).
10. Текст статьи должен быть разбит на части, заголовки должны быть подписаны: Аннотация (Abstract). Ключевые слова (Keywords). Введение (Introduction). Материалы и методы (Materials and methods). Литературный обзор (Literature Review). Результаты (Results). Обсуждение (Discussion). Заключение (Conclusion). Благодарности (Acknowledgements). Список литературы (References).
11. Аннотация — оптимальный объем 150 слов (не более 250 слов на русском языке или 200 на английском языке). При этом в случае несоответствия требованию издательство оставляет за собой право частичного изменения и сокращения аннотации. Это же касается и редактирования всего текста рукописи. Аннотация должна включать в себя информацию о цели исследования, методологии, результатах.
12. Ключевые слова — 5–10 слов. Ключевые слова отделяются друг от друга точкой с запятой. Требуется УДК, а также сопроводительное письмо из учреждения.
13. Включить JEL-коды, если применимо.
14. Список литературы приводится в алфавитном порядке, со сквозной нумерацией. Ссылки в тексте на соответствующий источник из списка литературы оформляются в круглых скобках, например: (1, с. 277). Использование автоматических постраничных ссылок не допускается. Список литературы

должен содержать не менее 20 источников за последние 3 года (для работ исторического характера могут быть сделаны исключения). Иностраных источников — не менее 15. Преимуществом станет использование статей, опубликованных в базах Scopus и Web of Science.

- Информация о цитируемой статье в журнале должна включать в себя: фамилию и имя автора, год публикации, название статьи, название журнала, том/номер/выпуск, страницы.
 - Информация об упоминаемой книге должна включать в себя: фамилию и имя автора, год публикации, название книги, название издательства, место публикации.
 - В случае с электронным источником информации обязательны ссылка и дата доступа.
 - Необходимо указать тип каждого источника: например, материалы конференции, и т.д. для исключения путаницы при оформлении списка литературы в соответствии с требованиями журнала.
15. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
 16. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
 17. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
 18. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном ранее материале авторов.
 19. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
 20. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
 21. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
 22. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологии России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 28.12.2021
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