

**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, Keramichesky 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

- Оптимизация процесса фильтрации иммунобиологических препаратов для диагностики опасных инфекционных болезней.
М.В. Овчинникова, Г.И. Коровкина, В.В. Рогожин, К.И. Холматов, Н.О. Макаров, Т.Ю. Кириллова, И.А. Плотников, О.С. Зинина, С.Ю. Гусев 6
- Антибактериальные свойства композита на основе природного алюмосиликата и хлоргексидина.
С.Б. Вениг, Р.К. Чернова, В.Г. Сержантов, Т.Ю. Русанова, А.Н. Микеров, О.Г. Шаповал, Е.И. Селифонова 12
- Влияние вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий вида *Proteus mirabilis*.
А.А. Вакарина, А.В. Алешкин, Е.О. Рубальский, Т.Ф. Степанова, И.А. Киселева, Л.В. Катаева, Э.Р. Зулькарнеев, Р.С. Календр 18
- Мембранные технологии в производствах иммунобиологических лекарственных препаратов, выпускаемых ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (подведение итогов исследований).
А.В. Комиссаров, Е.Г. Абрамова, О.А. Волох, М.В. Антонычева, С.В. Генералов, И.М. Жулидов, Л.В. Савицкая, А.Г. Селезнева, А.Ю. Ульянов, К.И. Холматов, Н.И. Вахрушина, Д.Н. Бибиков, А.К. Никифоров 26
- Исследование термостабильности фикоцианина цианобактерии *Arthrospira platensis*.
О.А. Манжелей, Е.А. Устинова, Д.В. Сухинов, Я.Э. Сергеева 47
- Формирование микробиоты и местного гуморального иммунитета полости рта и желудка у недоношенных новорожденных детей без и после приема антибиотиков и пробиотиков.
О.А. Петрова, В.М. Червинец, Ю.В. Червинец 55
- Получение водорастворимых фитомеланинов с использованием различных минеральных кислот.
И.А. Фоменко, Л.А. Иванова, Л.А. Чурмасова, И.А. Дегтярев 64
- Изучение эффективности питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» в ходе мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов и сточных вод на наличие холерного вибриона.
А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Л.М. Овсова, В.В. Лобанов, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, Д.В. Соков, Е.А. Меньшикова, Д.А. Левченко, М.И. Ежова, Е.Ю. Люкшина, Ю.Г. Киреев, В.В. Балахнова 69

Обзоры

- Особенности синтетической биологии как новой междисциплинарной области конвергентных исследований с высоким технологическим потенциалом.
К.Г. Гаев, Т.Н. Гаева, Р.Г. Васильев 75

Страницы истории. Юбилейные и знаменательные даты 2021 года 92

Хроника 94

Правила для авторов 95

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Optimization of the filtering process immunobiological preparations for diagnostics dangerous infectious diseases.

M.V. Ovchinnikova, G.I. Korovkina, V.V. Rogozhin, K.I. Kholmatov, N.O. Makarov, T.Yu. Kirillova, I.A. Plotnikov, O.S. Zinina, S.Yu. Gusev 6

Antibacterial properties of the composite based on natural aluminosilicate and chlorhexidine.

S.B. Venig, R.K. Chernova, V.G. Serzhantov, T.Yu. Rusanova, A.N. Mikerov, O.G. Shapoval, E.I. Selifonova 12

Influence of virulent bacteriophages on antibiotic sensitivity of *Proteus mirabilis* species.

A.A. Vakarina, A.V. Aleshkin, E.O. Rubalsky, T.F. Stepanova, I.A. Kiseleva, L.V. Kataeva, E.R. Zulkarneev, R.S. Kalendr 18

Membrane technologies in the production of immunobiological drugs manufactured by FGHI RusRAPI «Microbe» of the Rospotrebnadzor (summarizing research results).

A.V. Komissarov, E.G. Abramova, O.A. Volokh, M.V. Antonycheva, S.V. Generalov, I.M. Zhulidov, L.V. Savitskaya, A.G. Selezneva, A.Yu. Ul'yanov, K.I. Kholmatov, N.I. Vakhrushina, D.N. Bibikov, A.K. Nikiforov 26

Study of the thermostability of cyanobacterium *Arthrospira platensis* phycocyanin.

O.A. Manzheley, E.A. Ustinova, D.V. Sukhinov, Ya.E. Sergeeva 47

Formation of microbiota and local humoral immunity of the oral and stomach cavity in premature newborns without and after taking antibiotics and probiotics.

O.A. Petrova, V.M. Chervinets, Yu.V. Chervinets 55

Production of water-soluble phytomelanins using various mineral acids.

I.A. Fomenko, L.A. Ivanova, L.A. Churmasova, I.A. Degtyarev 64

Study of the effectiveness of the nutrient medium «Arginine-iron-sucrose agar» during monitoring studies of water in surface reservoirs and wastewater for the presence of *Vibrio cholerae*.

A.B. Mazrukho, D.I. Kaminsky, L.M. Ovsova, V.V. Lobanov, V.D. Kruglikov, I.V. Arkhangelskaya, D.V. Sokov, E.A. Menshikova, D.A. Levchenko, M.I. Ezhova, E.Yu. Lyukshina, Yu.G. Kireev, V.V. Balakhnova 69

Reviews

Features of synthetic biology as a new interdisciplinary field of convergent researches with high technological potential.

K.G. Gaev, T.N. Gaeva, R.G. Vasilov 75

Pages of history. Anniversary and significant dates 2021 92

The chronicle 94

Rules for authors 95

К читателям

Второй номер 2021 года содержит в основном оригинальные работы. В исследовании Овчинниковой М.В. и др. из РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов) оптимизирован способ многократного применения капсульных фильтров как наиболее технологичный вариант фильтровальной системы для внедрения в производство сывороточных и фаговых препаратов для диагностики чумы, холеры и псевдотуберкулеза.

В статье Венига С.Б. с сотрудниками (Саратовский национальный госуниверситет им. Н.Г. Чернышевского и Саратовский мединститут им. В.И. Разумовского) изучены антибактериальные свойства композита на основе природного алюмосиликата и хлоргексидина.

Группой работников из учреждений эпидемиологического профиля из Тюмени и Москвы (Вакарина И.И. и др.) проведено исследование влияния вирулентных макрофагов на антибиотикочувствительность бактерий рода *Proteus mirabilis*.

Коллектив сотрудников из Российского научно-исследовательского института «Микроб» (Саратов) в большом составе (Комиссаров А.В. и др.) представил результаты обстоятельного труда «Мембранные технологии в производствах иммунобиологических лекарственных препаратов, выпускаемых ФКУЗ РосНИПЧИ Роспотребнадзора (подведение итогов исследований)».

Манжелей О.А. с коллегами из Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» и МФТИ была изучена термостабильность у цианобактерии *Arthrospira platensis*.

Петрова О.А., Червинец В.М., Червинец Ю.В. (Тверской государственной медицинской университет) выполнили работу «Формирование микробиоты и местного гуморального иммунитета полости рта и желудка у недоношенных новорожденных детей после приема антибиотиков и пробиотиков». Показано, что в ротовой полости у недоношенных детей, получавших антибиотики, выделение лактобацилл возрастало в 7,8 раза и в 3 раза — при применении пробиотиков.

Фоменко И.А. и др. (Московский государственный университет пищевых производств) рассмотрели вопрос о получении водорастворимых фитомеланинов с использованием различных минеральных кислот.

Сотрудники противочумных учреждений Ростова-на-Дону Мазрухо А.Б. и др. провели изучение эффективности питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» при мониторинге водных сред на наличие холерного вибриона.

Авторами из Московской международной школы и Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Гаев К.Г., Гаева Т.Н., Василев Р.Г.) представлен обзор по синтетической биологии как нового направления конвергентных исследований.

В исторической части помещен материал к 100-летию со дня рождения видного отечественного микробиолога И.Н. Блохиной.

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

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ФИЛЬТРАЦИИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

М.В. ОВЧИННИКОВА*, Г.И. КОРОВКИНА, В.В. РОГОЖИН, К.И. ХОЛМАТОВ,
Н.О. МАКАРОВ, Т.Ю. КИРИЛЛОВА, И.А. ПЛОТНИКОВ, О.С. ЗИНИНА, С.Ю. ГУСЕВ

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

Исследована пропускная способность капсульного и дискового фильтра для производства диагностических препаратов на основе сывороток и бактериофагов. По оценке стерильности и специфичности профильтрованных полуфабрикатов определена возможность использования как дисковых мембранных фильтров, так и капсульных фильтров для стерилизующей фильтрации сывороточных препаратов различной степени вязкости. Оптимизирована технология многократного применения капсульных фильтров как наиболее технологичного и экономичного варианта фильтровальной системы для внедрения в производство сывороточных и фаговых препаратов для диагностики чумы, холеры и псевдотуберкулеза.

Ключевые слова: фильтрация, дисковые и капсульные фильтры, диагностические препараты.

Введение

В основе целенаправленной борьбы с любыми опасными инфекционными болезнями лежит их своевременная диагностика. Для чумы, холеры и других конвенционных инфекций очень важна постановка диагноза в кратчайшие сроки с целью определения объемов проведения противоэпидемических и профилактических мероприятий.

На сегодняшний день, несмотря на активное внедрение современных методов диагностики инфекционной патологии в лабораторную практику (генодиагностические методы — ПЦР, ИФА тест-системы и т.д.), диагностические бактериофаги, агглютинирующие сыворотки и иммуноглобулины, препараты для флуоресцентной микроскопии не теряют своей актуальности и востребованности.

Производство медицинских изделий (МИ) для *in vitro* диагностики — это сложный многоступенчатый процесс, требующий качественного выполнения каждого технологического этапа, от которого за-

висит качество конечного продукта. Особенно это касается этапа фильтрации, обеспечивающей общую и специфическую стерильность полуфабрикатов диагностических препаратов. Во время фильтрации направленно удаляются интактные фагорезистентные клетки штамма-продуцента в питательной среде при производстве бактериофагов, а также тонкие слабо-сидиментирующие примеси, в основном в виде коллоидных частиц различной природы, например, денатурированные белки, возникающие в процессе изготовления сывороточных препаратов, присутствие которых вызывает опалесценцию раствора. Правильный подбор фильтровального оборудования и фильтровального материала служит одним из ключевых моментов производства МИ, так как, в отличие от других методов стерилизации, фильтрация позволяет обрабатывать препараты, содержащие различные лабильные компоненты, обеспечивая стерильность с максимальной сохранностью их диагностических качеств [1]. При этом выбор фильтрационных средств должен обеспечить возможность пропускать большие объемы растворов с необходимым запасом надежности по улавливанию частиц загрязнений [2].

Традиционно для осветляющей и стерилизующей фильтрации сывороток и иммуноглобулиновых фракций применяются бактериальные асбестовые фильтры — фильтры Зейтца, состоящие из фильтровального аппарата, изготовленного из нержавеющей стали или сплавов и имеющего различную емкость, и фильтро-

© 2021 г. Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Рогожин В.В., Холматов К.И., Макаров Н.О., Кириллова Т.Ю., Плотников И.А., Зинина О.С., Гусев С.Ю.

* Автор для переписки:

Овчинникова Мария Владимировна,
к.б.н., зав. лабораторией диагностических препаратов, ФКУЗ
РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов
E-mail: begemot2006@list.ru

важных пластин толщиной 4–6 мм, сделанных из смеси асбеста и клетчатки. Для производства бактериофагов используются керамические фильтры с диаметром максимальных пор от 1,9–2,5 мкм до 0,9–1,3 мкм (свечи Шамберлана), изготовленные из каолина с примесью кварца путем их обжига.

Несмотря на многолетний успешный опыт использования и фильтра Зейтца и свеч Шамберлана к их недостаткам можно отнести низкую пропускную способность и возможную контаминацию как пор фильтра, так и самого фильтрата при осуществлении длительных фильтраций [6]. В этом случае в силу вступает ограничение объемов фильтруемой жидкости, что удлиняет общее время производственных мероприятий. Трудности возникают и при фильтрации цельных сывороточных препаратов. Керамические и асбестовые фильтры в связи с их высокой адсорбционной способностью предварительно насыщаются жидкой фазой, а введение дополнительного объема жидкости может привести к снижению специфической активности диагностического препарата.

Сыровой Н.А. с соавт. был предложен способ фильтрации бактериофагов ПБА I–II групп патогенности через дисковый фильтр («Владисарт», Россия) на основе ацетата целлюлозы (ФМАЦ) с размером пор 0,2 мкм [5]. Однако данный метод имеет ряд недостатков, среди которых наиболее значимыми являются частые прорывы мембранной части фильтра и негерметичное соединение конструктивных элементов установки, что может привести к аварийной ситуации при работе с патогенными биологическими агентами. Испытанные капсульные фильтры «Sartorius AG» с успехом были применены при стерилизующей фильтрации экспериментальных серий бактериофагов, но были неприемлемы на производственных этапах с точки зрения рентабельности.

Сейчас подход к совершенствованию производства иммунобиологических препаратов, повышению их качества и надежности сводится к необходимости комплексного внедрения высокотехнологичной аппаратуры и технологий с учетом требований биологической и экологической безопасности, снижения производственных и энергетических затрат [3]. Производство медицинских изделий для *in vitro* диагностики также требует постоянного совершенствования и модернизации.

В связи с этим целью нашей работы заключалась в апробации современных систем фильтрации и выборе наиболее технологичного варианта для внедрения в производство сывороточных и фаговых препаратов для диагностики чумы, холеры и псевдотуберкулеза.

Материалы и методы

Фильтрации подвергались следующие полуфабрикаты диагностических препаратов: сыворотка холерная О1 в цельном виде и сыворотка холерная не О1 группы О139, разведенная 1:10; иммуноглобулины чумные флуоресцирующие; фаголизат бульонной культуры *Y. pseudotuberculosis*, представляющий собой взвесь потомства фага, остатков лизированных фагочувствительных клеток штамма-продуцента, интактных фагорезистентных клеток штамма-продуцента в питательной среде. К данной процедуре допускались сыворотки, иммуноглобулины и фаголизат прозрачные или с легкой степенью опалесценции.

Для фильтрации фаголизатов использовали капсульный фильтр на основе ацетата целлюлозы («Sartobran P», Германия). Для проведения фильтрации сывороточных и иммуноглобулиновых препаратов использовали как дисковый фильтр («Владисарт», Россия) на основе ацетата целлюлозы (ФМАЦ), так и капсульный фильтр «Sartorius P». Диаметр пор у всех представленных фильтров составлял 0,2 мкм.

Сравнивая пропускную способность фильтров, процедуру фильтрации всех взятых в опыт препаратов проводили не менее 3 раз. Затем осуществляли контроль специфической стерильности фагофильтрата и контроль общей стерильности сывороток и иммуноглобулинов, показатель стерильности выражали в %.

Процесс фильтрации осуществляли в следующих условиях: температура исходного раствора 37 ± 2 °С — для фаголизата, 20 ± 2 °С — для сывороток и иммуноглобулинов; давление — 0,08 МПа. Подготовка фильтроэлементов «Владисарт» заключалась в предварительной стерилизации фильтродержателя с мембраной под давлением $0,11 \pm 0,01$ МПа при температуре 120 ± 2 °С в течение 30 мин.

Для консервации капсульных фильтров после проведения фильтрации сывороток и иммуноглобулинов капсулу промывали водой очищенной, заливали растворами щелочи в различных концентрациях 0,25, 0,5 и 1,0% на 30 мин, промывали водой очищенной. Для консервации использовали 10, 20 и 50% растворы этилового спирта. Капсулы хранили в межпроизводственный период до 6 месяцев (срок наблюдения) при температуре 6 ± 1 °С. Для последующей фильтрации капсулу освобождали от раствора консерванта, промывали водой очищенной и стерилизовали при температуре 120 ± 2 °С в течение 30 мин.

Для определения возможности повторного использования фильтровальной капсулы для бактериофагов, после процедуры фильтрации фильтр обеззараживали путем по-

гружения в соответствующий дезинфицирующий раствор в течение 2 часов или автоклавирования при температуре 126 ± 2 °С и давлении $0,15 \pm 0,01$ МПа в течение 1 ч. Следующие этапы промывки и консервации были аналогичны приведенным выше.

Результаты и обсуждение

В настоящее время на рынке фильтрационных материалов и оборудования для фармацевтической, пищевой промышленности, учреждений медицинского и научного профиля представлена продукция различных российских и зарубежных компаний. Большой выбор фильтрующих элементов дает возможность решить конкретную задачу по очистке и стерилизации любых биологических субстанций [8].

Существующие фильтрующие элементы по механизму удержания частиц подразделяются на мембранные, глубинные и сорбционно-фильтрующие; в зависимости от фильтрующего материала — гидрофобные, предназначенные для фильтрации газовых и жидких сред, или гидрофильные — для фильтрации жидкостей; по способу упаковки фильтрующего материала разделяются на гофрированные или негофрированные, а также, в зависимости от объемов фильтрации, отличаются конструктивным исполнением — диски, капсулы, мини-патроны, стандартные картриджи (элементы патронного типа) [9].

Выпускаемые фильтрующие элементы могут быть использованы как для предварительной, так и для финишной фильтрации. Правильный выбор оборудования и фильтровального материала определяется не только качеством требуемого продукта, но и экономичностью и оптимальной технологичностью системы для каждого конкретного случая.

Дисковые фильтры, выбранные для проведения эксперимента, представляют собой ацетатцеллюлозные мембраны «Владипор» с размером пор $0,20$ мкм, общей пористостью от 80 до 85%. Техническими особенностями данных фильтров являются их нетоксичность и устойчивость при стерилизации автоклавированием или γ -облучением, что позволяет проводить стерилизующую фильтрацию различных водных растворов и биологических жидкостей. Производительность фильтрованной мембраны по дистиллированной воде при $p=0,05$ МПа составляет $6,00-9,99$ мл/(см²мин). Для осуществления процесса фильтрации применяли фильтродержатель АСФ-011 ЗАО «Владисарт» из химически стойкой нержавеющей стали с удобным доступом для укладки мембран. Максимальная температура эксплуатации (150 °С) позволяла проводить обеззараживание фильтра путем

автоклавирования. Для обеспечения отрицательного давления до 40 кПа использовали вакуумно-нагнетательный химически стойкий насос WP 220 50 «Millipore».

Капсульный вариант фильтра производства «Sartorius AG» — это неразъемная фильтровальная капсула Sartobran с мембраной предфильтра и финального фильтра. Двойная асимметричная мембрана из полиэфирсульфона с размерами пор $0,45$ мкм — $0,20$ мкм обуславливает высокую селективность удерживания коллоидных частиц различной природы и бактерий, что особенно важно в производстве иммунобиологических препаратов. Вследствие высокой механической прочности и широкого диапазона рабочих температур (до 125 °С) допускается стерилизация путем автоклавирования минимум 25 циклов при максимальной температуре 134 °С, 2 бар, в течение 30 мин. Высокая химическая стойкость в значительном диапазоне значений pH (1–13) позволяет проводить химическую регенерацию и применять агрессивные жидкости в качестве обеззараживающих и консервирующих агентов [4].

Монтаж фильтровальных систем и процесс фильтрации представляют собой процессы, не требующие больших энергетических и материальных затрат и не предполагающие специальной подготовки персонала. После фильтрации фильтродержатель с мембранами и капсулы подвергались обеззараживанию путем автоклавирования или погружения в дезинфицирующий раствор соответствующей концентрации.

Эффективность фильтрации — это общая и специфическая стерильность конечного продукта, а также сохранение спецификационных характеристик препарата, обуславливающих его применение. Для оценки эффективности процесса фильтрации фиксировали пропускную способность фильтровального материала и определяли специфическую активность в профильтрованном полуфабрикаты сывороток и иммуноглобулинов (табл. 1).

Показатель стерильности проведенных процедур фильтраций, равный 100%, и неизменный уровень специфических антител, характеризующий активность диагностических препаратов до и после фильтрации, позволяют сделать вывод о том, что ФМАЦ и Sartobran P0,45+0,2 могут использоваться для фильтрации как сывороточных, так и иммуноглобулиновых препаратов с различной степенью вязкости.

Однако капсульный фильтр представляется более эффективной и технологичной фильтровальной системой, которая в более короткий период времени дает возможность получить активный стерильный продукт; к тому же не требуются дополнительные комплектующие.

Как было уже сказано, высокая механическая и химическая устойчивость капсульных фильтров допускает обработку путем автоклавирования минимум 25 циклов и применение агрессивных жидкостей в качестве

консервирующих и обеззараживающих агентов. Такое многократное использование капсул делает данный фильтровальный материал выгодным с позиции экономической эффективности производства.

Таблица 1

Результаты испытаний стерилизующих фильтров

Тип фильтра Препарат	ФМАЦ				Sartobran P0,45+0,2			
	Пропускная способность, л/час	Количество стерильных процедур, %	Специфическая активность		Пропускная способность, л/час	Количество стерильных процедур, %	Специфическая активность	
			До фильтрации	После фильтрации			До фильтрации	После фильтрации
Сыворотка холерная О1, цельная	12,4±1,0	100	1:3200	1:3200	14,2±0,1	100	1:3200	1:3200
Сыворотка холерная не О1 группы О139, разведенная 1:10	18,3±0,4	100	1:10	1:10	20,4±0,5	100	1:10	1:10
Иммуноглобулины чумные флуоресцирующие	15,3±0,7	100	1:8	1:8	16,3±1,0	100	1:8	1:8

В связи с этим были определены условия стерилизации и консервации капсульного фильтра для проведения многократной фильтрации сывороточных и фаговых полуфабрикатов до исчерпывания всего ресурса фильтровальной поверхности без ущерба качеству конечного продукта.

Установлено, что переменная двойная промывка капсулы водой, очищенной в объеме 5,0–7,0 м³, и 0,5% раствором щелочи, оказывает очищающее действие на фильтровальную мембрану и конструкцию в целом. Использование в качестве консерванта 20%-ного раствора этилового спирта не приводило к деформации мембраны, но оказывало ингибирующее действие на рост и развитие посторонней микрофлоры в фильтрующем элементе. Определено, что после фильтрации фаголизата, содержащего ПБА III группы патогенности, эффективным

и щадящим способом обеззараживания является погружение капсулы в дезинфицирующий раствор (3% раствор перекиси водорода с 0,5% моющим средством) в течение 2 часов.

Перед процессом стерилизации все используемые повторно фильтры подвергали проверке на целостность (тест «точка пузырька») и оценке пропускной способности по сыворотке холерной О139 кроличьей, разведенной 1:10, и бактериофагу псевдотуберкулезному (табл. 2).

Результаты показали, что при многократном использовании (до 20 раз) фильтровальной капсулы после восстановительных процедур целостность фильтров сохранялась в 88,25% случаях. Пропускная способность фильтров изменялась прямо пропорционально количеству циклов консерваций и стерилизаций.

Таблица 2

Результаты испытаний капсульных фильтров

Количество консерваций и стерилизующих процедур	% положительных испытаний	Пропускная способность, л/час	
		Сыворотка холерная О139	Бактериофаг псевдотуберкулезный
От 1 до 5	100	20,5±1,0	23,2±0,5
От 5 до 10	100	18,3±0,6	20,1±0,3
От 10 до 15	85	18,2±1,0	18,5±0,2
От 15 до 20	68	5,3±1,0	10±0,1
От 20 до 25	49	2,1±0,2	4,1±0,3

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований подобраны фильтровальные материалы и оптимизирован способ проведения процедуры стерилизующей фильтрации для каждой группы препаратов для диагно-

стики особо опасных инфекций. При корректном соблюдении предложенных режимов эксплуатации, с учетом технических характеристик используемых фильтров возможен не только выпуск качественных медицинских изделий для in vitro диагностики, но и достижение экономической эффективности производственного процесса.

Литература

1. Вильнер В.Я., Аркатов Ю.М., Коршунова Т.А., Артамонов В.А. Стерилизующая фильтрация биологических жидкостей с помощью микрофильтрационных мембран // Химико-фармацевтический журнал. — 1988. — Т. 22. — № 8. — С. 1001–1004.
2. Комиссаров А.В., Комоско Г.В., Лещенко А.А., Луб М.Ю., Пименов Е.В., Дармов И.В., Климов В.И., Логвинов С.В. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибирезвенного лошадиного глобулина // Биотехнология. — 2002. — № 2. — С. 66–74.
3. Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Биотехнология иммунобиологических препаратов. — Харьков: Фармитэк, 2008. — 312 с.
4. Крещик А.А. Полиэфирсульфоны и их применение в мембранных технологиях // Научное сообщество студентов: Междисциплинарные исследования: эл. сб. ст. по мат. IX междунар. студ. науч.-практ. конф. — Новосибирск: Изд. АНС «СибАК». — 2016. — № 6(9)/ [Электронный ресурс] — Режим доступа. — URL: [http://www.sibac.info/archive/science/6\(9\).pdf](http://www.sibac.info/archive/science/6(9).pdf) (дата обращения: 19.03.2020).
5. Сырова Н.А., Коровкина Г.И., Зинина О.С., Красичков Г.Г., Овчинникова М.В. Применение модульной системы фильтрации для производства диагностических бактериофагов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12. — № 2. — С. 18–22.
6. Технология лекарственных препаратов / Под ред. Жданова А.С. — М.: Медицина, 2006.
7. Чистохин Ю.Г., Танцерева И.Г., Большаков В.В., Кульпина Т.Г. Современные лекарственные формы. Учебное пособие. — Кемерово: Изд. Кемеровская государственная медицинская академия. 2007. — 92 с.
8. https://www.express-eco.ru/publications/filtratsiya_trudnofiltruemyh_zhidkostey (дата обращения: 23.03.2020).
9. <https://www.technofilter.ru/prod/> (дата обращения: 23.03.2020).

References

1. Vil'ner VYa, Arkatov YuM, Korshunova TA, Artamonov VA. Sterilizuyushchaya fil'tratsiya biologicheskikh zhidkostey s pomoshch'yu mikrofil'tracionnykh membran. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal 1988; 22(8):1001–1004 (in Russian).
2. Komissarov AV, Komosko GV, Leshchenko AA, Lub MYu, Pimenov YeV, Darmov IV, Klimov VI, Logvinov SV. Izucheniye protsessy sterilizuyushchey fil'tratsii zhidkogo protivosibireyazvennogo loshadinogo globulina. Biotekhnologiya 2002; 2:66–74 (in Russian).
3. Krasnopol'skiy YuM, Borshchevskaya MI. Biotekhnologiya immunobiologicheskikh preparatov. Khar'kov: Farmitek, 2008: 312. (in Russian).
4. Kreshchik AA. Poliefirsul'fony i ikh primeneniye v membran-nykh tekhnologiyakh. Nauchnoye soobshchestvo studentov: Mezhdistsiplinarnyye issledovaniya: el. sb. st. po mat. IX mezhdunar. stud. nauch.-prakt. konf. Novosibirsk: Izd. ANS «SibAK» 2016; 6(9)/ [Elektronnyy resurs] — Rezhim dostupa. URL: [http://www.sibac.info/archive/science/6\(9\).pdf](http://www.sibac.info/archive/science/6(9).pdf) (data obrashcheniya: 19.03.2020). (in Russian).
5. Syrova NA, Korovkina GI, Zinina OS, Krasichkov GG, Ovchinnikova MV. Primneniye modul'noy sistemy fil'tratsii dlya proizvodstva diagnosticheskikh bakteriofagov. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova 2016; 12(2):18–22 (in Russian).
6. Tekhnologiya lekarstvennykh preparatov. Pod red Zhdanova AS. Moscow: Meditsina, 2006 (in Russian).
7. Chistokhin YuG, Tantsereva IG, Bol'shakov VV, Kul'pina TG. Sovremennyye lekarstvennyye formy. Uchebnoye posobiye. Kemerovo: Izd Kemerovskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya, 2007: 92. (in Russian).
8. https://www.express-eco.ru/publications/filtratsiya_trudnofiltruemyh_zhidkostey (data obrashcheniya: 23.03.2020). (in Russian).
9. <https://www.technofilter.ru/prod/> (data obrashcheniya: 23.03.2020) (in Russian).

OPTIMIZATION OF THE FILTERING PROCESS IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS FOR DIAGNOSTICS DANGEROUS INFECTIOUS DISEASES

M.V. OVCHINNIKOVA, G.I. KOROVKINA, V.V. ROGOZHIN, K.I. KHOLMATOV,
N.O. MAKAROV, T.Yu. KIRILLOVA, I.A. PLOTNIKOV, O.S. ZININA, S.Yu. GUSEV

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» Rospotrebnadzor, Saratov

The throughput capacity of the capsule and disc filter for the production of diagnostic preparations has been investigated based on serums and bacteriophages. By assessing the sterility and specificity of filtered semi-finished products, it was determined the possibility of using both disc membrane filters and capsule filters for sterilizing filtration serum preparations of varying viscosity. Optimized the technology of multiple use of capsule filters as the most technologically advanced and economical variant of the filter system for implementation in production serum and phage preparations for the diagnosis of plague, cholera and pseudotuberculosis.

Keywords: filtration, disc and capsule filters, diagnostic preparations.

Address:

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

Для цитирования:

Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Рогожин В.В., Холматов К.И., Макаров Н.О., Кириллова Т.Ю., Плотников И.А., Зинина О.С., Гусев С.Ю. Оптимизация процесса фильтрации иммунобиологических препаратов для диагностики опасных инфекционных болезней. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):6–11.

For citation:

Ovchinnikova M.V., Korovkina G.I., Rogozhin V.V., Kholmatov K.I., Makarov N.O., Kirillova T.Yu., Plotnikov I.A., Zinina O.S., Gusev S.Yu. Optimization of filtration process of immunobiological drugs for diagnostic of the dangerous infectious diseases. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):6–11 (in Russian).

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО АЛЮМОСИЛИКАТА И ХЛОРГЕКСИДИНА

С.Б. ВЕНИГ^{1*}, Р.К. ЧЕРНОВА¹, В.Г. СЕРЖАНТОВ¹, Т.Ю. РУСАНОВА¹,
А.Н. МИКЕРОВ², О.Г. ШАПОВАЛ², Е.И. СЕЛИФОНОВА¹

¹ Саратовский национальный государственный университет имени Н.Г. Чернышевского;

² Саратовский медицинский институт имени В.И. Разумовского, Саратов

Глауконит является одним из наиболее часто используемых природных сорбентов, в том числе для создания компози- тов с антимикробными свойствами. В статическом режиме при комнатной температуре осуществлена сорбция хлоргексидина биглюконата на глауконите. Антибактериальную активность полученного композита в отношении *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* FDA 209P определяли путем культивирования указанных штаммов в фазе адаптации в ожидаемых субингибирующих концентрациях хлоргексидина, создаваемых навесками компо- зита как в большом, так и малом объеме мясо-пептонного бульона. Установлено, что глауконит является хорошим сорбентом для хлоргексидина биглюконата, сорбционная емкость глауконита к хлоргексидину биглюконату составила $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/г, а степень извлечения — 85%. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) хлоргексидина биглюконата составила 15 мкг/мл в отношении *P. aeruginosa* ATCC 27835 и 3 мкг/мл — в отношении *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* FDA 209P. При культивировании опытных штаммов в эквивалентных МИК хлоргексидина биглюконата навесках композита отмечено снижение его бактерицидной активности.

Ключевые слова: хлоргексидин, глауконит, композит, антибактериальная активность.

Введение

Глауконит — природный водный алюмосиликат, который широко распространен во всем мире и в Рос- сии, в частности. Алюмосиликаты — соли алюмокрем- ниевых кислот, к которым в природе относится боль- шая группа минералов класса силикатов. Наибольшее практическое значение имеют цеолиты, ионообменные и адсорбционные свойства которых широко используют в газовой и химической промышленности, а также для очистки воды и др. Сорбционные процессы являются одними из важнейших методов в водоочистке. При- меняются природные алюмосиликаты, в том числе глаукониты, в качестве твердых очищающих сорбентов в технологических схемах по очистке питьевых и сточ- ных вод от радионуклидов стронция и цезия [5]. Рас-

смотрена возможность и перспективы использования природных алюмосиликатов нефелиновых, цеолитовых и глауконитовых пород при очистке оборотных, сточных и хозяйственно-бытовых вод от тяжелых металлов, ор- ганических соединений и других загрязняющих веществ. Установлено, что очистка и доочистка загрязненных вод алюмосиликатами природного происхождения на основе минералов нефелиновых и цеолит-глауконитовых пород в качестве флокулянт-коагулянтов и фильтрующих за- грузок экологически безопасна и требует значительно меньших затрат энергии и материальных ресурсов [6]. Исследована сорбционная способность алюмосиликатов по отношению к дисперсиям нерастворимых красите- лей и пигментов [3]. Изучены сорбционные свойства образцов глауконита при извлечении ими ионов Zn^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} из водных сред [7]. Согласно современным данным, глауконит показывает хорошие результаты очистки от органических загрязнителей, тяжелых метал- лов, пестицидов, радионуклидов и прочих потенциально опасных веществ [2].

Белоозерское месторождение Саратовской обла- сти является одним из крупных на территории России. Наряду с широким распространением, существенными преимуществами этого минерала представляются также низкая стоимость, высокие сорбционные и ионообменные

© 2021 г. Вениг С.Б., Чернова Р.К., Сержантов В.Г., Русанова Т.Ю., Микеров А.Н., Шаповал О.Г., Селифонова Е.И.

* Автор для переписки:

Вениг Сергей Борисович

доктор физико-математических наук, декан факультета нано- и био- медицинских технологий, профессор по кафедре материаловедения, технологии и управления качеством, Саратовский национальный государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

E-mail: wenigsb@mail.ru

свойства, отсутствие токсичности, термостойкость, зернистая структура, а также возможность направленного изменения технологических параметров минерала посредством структурной и химической модификации. В связи с этим глауконит Саратовской области изучается в различных направлениях. Исследуется эффективность сорбции глауконитом органических веществ из водных растворов [10], физико-химические свойства и морфология поверхности зерен глауконита [12], влияние добавления глауконита в корм цыплятам-бройлерам [8], антибактериальная активность композитов на основе глауконита [11] и др. Имея слоистую структуру и хорошие сорбционные свойства, глауконит может рассматриваться как матрица для создания антибактериальных композитов, для применения в животноводстве, сельском хозяйстве, медицине (энтеросорбенты) и др.

Материалы и методы

В качестве матрицы для получения композита использовали обогащенную фракцию глауконита, полученную из глауконитового песка Белоозерского месторождения методом сухой магнитной сепарации, подробно описанной в работе [10]. Содержание глауконита в исследуемом образце составило примерно 85%. Морфологические характеристики обогащенного глауконита изучали в сканирующем электронном микроскопе MIRA 2 LMU («Tescan», Чехия). Для измерения оптической плотности растворов до и после сорбции использовался двухлучевой спектрофотометр Shimadzu UV-2550(PC) (Япония) в спектральном диапазоне 400–800 нм. Источником излучения служила галогеновая лампа с фильтрацией излучения в исследуемом спектральном диапазоне. Нормировка спектров перед началом измерений проводилась на сигнал от эталонного отражателя BaSO₄. Все эксперименты проводились при комнатной температуре (25 °С) и нормальном атмосферном давлении. Измерение pH реакционной среды проводили с помощью pHметра EL2-Kit («Mettles-Toledo», Швейцария).

Биологически активным веществом для получения композита был выбран хлоргексидина биглюконат (Россия). Рабочие растворы получались разбавлением препарата дистиллированной водой.

Получение композита глауконита с хлоргексидином биглюконатом проводили методом сорбции в статическом режиме при комнатной температуре. Для этого в конические колбы вместимостью 100 мл помещали навески глауконита (0,5 г) и заливали 25 мл исходного водного раствора хлоргексидина $C_{исх} = 2,70 \cdot 10^{-5}$ М. Кон-

центрации сорбата определяли спектрофотометрически по предварительно построенному градуировочному графику.

Сорбцию проводили в течение 60 мин при постоянном перемешивании. Затем раствор фильтровали через складчатый фильтр, предварительно смоченный в исследуемом растворе (для исключения потери массы в фильтрате), отделяли глауконитовый композит от маточного раствора и три раза промывали осадок дистиллированной водой (порциями по 10 мл) для удаления избытка используемых реагентов. Оставшуюся твердую фазу высушивали при комнатной температуре.

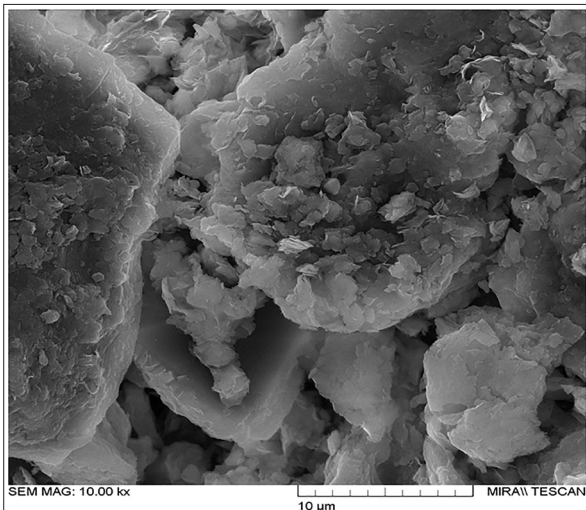
Антибактериальную активность композита определяли в отношении трех штаммов: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* FDA 209P. С этой целью навески композита, содержащие ожидаемую субингибирующую концентрацию хлоргексидина биглюконата (исходя из значения его минимальной ингибирующей концентрации и содержания в единице массы глауконита), помещали в широкодонные колбы и добавляли 10 мл стерильного мясо-пептонного бульона, после чего взвесь суточной агаровой культуры опытного штамма инокулировали из расчета 10⁴ КОЕ/мл питательной среды.

Также использовали другую методику, при которой к такой навеске композита в чашках Петри малого диаметра добавляли 0,2 мл мясо-пептонного бульона, содержащего 2×10⁴ КОЕ, с целью создания практически непосредственного контакта композита с тест-штаммами в случае плохого проникновения сорбированного хлоргексидина в питательный бульон [4]. Параллельно использовали соответствующие навески глауконита, субингибирующую концентрацию хлоргексидина биглюконата и мясо-пептонный бульон без добавления опытных веществ. Через 3 часа инкубации колб и чашек Петри при температуре 37 °С осуществляли мерный высеv на мясо-пептонный агар. Перед высевом к навескам композита и глауконита в чашках Петри добавляли по 0,8 мл стерильного физиологического раствора. Через 24 часа инкубации подсчитывали количество выросших колоний.

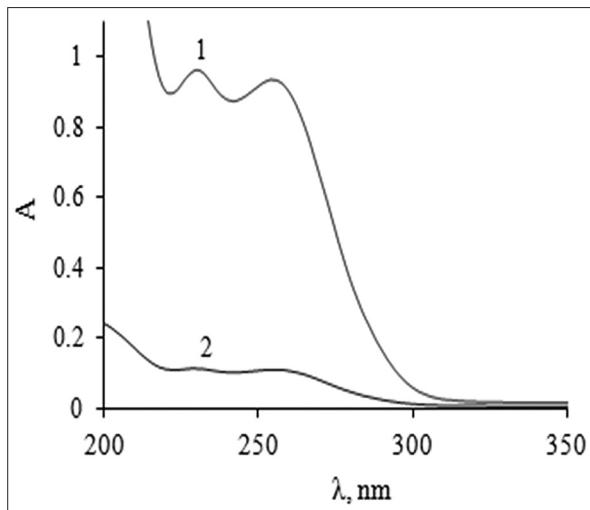
Для статистической обработки полученных результатов определяли достоверность различий (с вероятностью 95%) между найденными значениями средней арифметической количества колоний и стандартного отклонения от ее значений ($M \pm m$). Определение МИК хлоргексидина биглюконата осуществляли методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне при микробной нагрузке 10⁴ КОЕ/мл.

Результаты

В исследуемом образце обнаружены различные по форме и размеру зерна глауконита. Размеры зерен варьировали от 100 до 400 мкм. При большом увеличении установлена слоистая наноструктурная поверхность, образованная из чешуек различных размеров (от 40 до 900 нм). Толщина чешуек варьирует от 10 до 90 нм, расстояние между чешуйками колеблется от 10 до 250 нм.



а



б

Рис. 1. а — электронная микрофотография поверхности обогащенного глауконита (ув. в 10000 раз); б — спектры поглощения раствора хлоргексидина биглюконата до (1) и после (2) сорбции глауконитом

Поверхность зерен глауконита имеет слоистую чешуйчатую структуру (рис. 1а), которой во многом обуславливаются хорошие сорбционные свойства. Спектры поглощения раствора хлоргексидина биглю-

коната до и после сорбции глауконитом представлены на рис. 1б.

Хлоргексидин является амфипатической молекулой с гидрофильными и гидрофобными группами, представляет собой катион при физиологическом значении $pH = 7,1$.

Рассчитывая сорбционную емкость глауконитовой матрицы (CE , моль/г) по величинам исходной ($C_{исх}$) и остаточной ($C_{ост}$) концентраций веществ для иммобилизации, с учетом массы сорбента:

$$CE = \frac{(C_{исх} - C_{ост}) \cdot V}{m}, \text{ где}$$

$C_{исх}$ — концентрация антибактериального вещества до сорбции, моль/л;

$C_{ост}$ — концентрация антибактериального вещества после сорбции, моль/л;

V — объем раствора, из которого проводили сорбцию (25 мл);

m — масса глауконитовой матрицы (0,5 г);

$$C_{исх} = 2,70 \cdot 10^{-5} \text{ М,}$$

получили остаточную концентрацию хлоргексидина в растворе после сорбции глауконитом $C_{ост} = 0,41 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Степень извлечения сорбата R оценивали по формуле:

$$R = (C_{исх} - C_{ост}) / C_{исх} \cdot 100\%.$$

$$R = (2,70 \cdot 10^{-5} - 0,41 \cdot 10^{-5}) \cdot 100\% / 2,70 \cdot 10^{-5} \approx 85\%.$$

Из полученных данных видно, что сорбционные процессы на глауконитовой матрице происходят эффективно: сорбционная емкость к хлоргексидину биглюконату составляет $1,2 \cdot 10^{-6}$ моль/г, а степень извлечения $R = 85\%$.

Значения МИК концентрации хлоргексидина биглюконата составили для штамма *P. aeruginosa* ATCC 27835 15 мкг/мл, для штамма *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* FDA 209P — 3 мкг/мл. При инкубировании всех штаммов в навесках композита, помещенных в мясо-пептонный бульон в широкодонных колбах, значения $M \pm m$ существенно не отличались от таковых в глауконите и мясо-пептонном бульоне. При контактном культивировании штаммов на навесках композита за указанный период, согласно полученным значениям $M \pm m$, указанная тенденция сохранилась (табл. 1).

Значения $M \pm m$ на 3-й час культивирования

Вид	Контроль (МПБ)	Глауконит	Композит (инкубация в широкодонной колбе)	Композит (контактное культивирование)	Хлоргексидина биглюконат
<i>S. aureus</i> FDA 209 P	109±11	90±13	121±7	100±7	9±3
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27835	77±14	89±16	109±10	108±22	5±2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	114±12	95±14	93±14	84±15	35±14

Обсуждение

Сорбционная активность глауконита обусловлена его структурой. Глаукониты относятся к группе силикатов, в их кристаллической решетке на одну сетку октаэдров приходится две сетки тетраэдров, обращенных своими вершинами навстречу друг к другу. Благодаря слоистой структуре глауконит имеет хорошие сорбционные свойства своей поверхности по всей площади чешуек. Он склонен к реакциям ионного обмена. В глауконите обменные реакции идут по сколам и всей площади внешних базальных поверхностей кристаллической решетки и создается избыток отрицательных зарядов, покрывающийся обменными катионами, которые адсорбируются на внешних и внутренних поверхностях слоев [1].

Значительная утрата хлоргексидина биглюконатом антимикробной активности после сорбции обусловлена его химической структурой и структурой глауконита. Известно, что одним из механизмов бактерицидного действия хлоргексидина является взаимодействие его катионной молекулы с отрицательно заряженными химическими группами структур клеточной стенки и цитоплазматической мембраны бактерий [9]. Частицы глауконита, несущие обильные анионные структуры на своей поверхности, в процессе сорбции прочно связывают молекулу хлоргексидина и таким образом нейтрализуют ее антимикробное действие.

Заключение

На основании выполненного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Определена сорбционная емкость глауконита Белоозерского месторождения Саратовской области по отношению к хлоргексидина биглюконату.
2. Определено количество иммобилизованного биологически активного вещества на глауконитовую матрицу.

3. Установлено, что хлоргексидина биглюконат в составе композита значительно утрачивает свою антибактериальную активность в отношении тест-штаммов грамотрицательных бактерий — *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и грамположительных бактерий — *S. aureus* ATCC 6538 P.

Литература

1. Бельчинская Л.И., Ходосова Н.А., Новикова Л.А., Стрельникова О.Ю., Реснер Ф., Петухова Г.А., Жабин А.В. Регулирование сорбционных процессов на природных нанопористых алюмосиликатах // Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2016. — Т. 52. — № 4. — С. 363–370.
2. Везенцев А.И., Кормош Е.В., Здоренко Н.М., Голдовская-Перистая Л.Ф. Адсорбционные свойства продуктов обогащения природных монтмориллонитро-содержащих глин // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. — 2011. — № 9. — С. 103–109.
3. Григорьева А.И., Владимирцева Е.Л., Шарнина Л.В., Хабибрахманов И.Р. Эффективность извлечения нерастворимых красителей из водных дисперсий алюмосиликатами // Вестник технологического университета. — 2016. — Т. 19. — № 19. — С. 116–120.
4. Долгих В.Т., Долгих Т.И., Пьянова Л.Г., Лихолобов В.А., Баринов С.В., Баракина О.В., Гриценко Н.С., Толкач А.Б. Антимикробная активность гранулированных углеродных сорбентов // Российский иммунологический журнал. — 2014. — Т. 18. — № 8. — С. 788–791.
5. Кутергин А.С., Кутергина И.Н. Природные алюмосиликаты для очистки воды от радионуклидов техногенного происхождения // Водоочистка, водоподготовка, водоснабжение. — 2014. — Т. 75. — № 3. — С. 12–13.
6. Ламскова М.И., Новиков А.Е. Возможности и перспективы очистки сточных, оборотных и хозяйственно-бытовых вод природными алюмосиликатами // Известия Волгоградского государственного технического университета: межвузовский сборник научных статей. — Волгоград, 2014. — С. 77–80.
7. Мартельянов Д.В., Рудмин М.А., Кухарь Д.А., Сапрыкин Ф.Е., Слепнёв А.М., Казанцев С.О., Мартельянов Д.В.

- мьянова И.В. Исследование сорбционных свойств образцов глауконита при извлечении ими ионов Zn^{2+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} из водных сред // Теоретические и практические проблемы развития современной науки: материалы XV Международной научно-практической конференции, Махачкала, 30 ноября 2017 года. — Махачкала: Общество с ограниченной ответственностью «Апробация», 2017. — С. 13–14.
8. Aydin Ö.D., Yildiz G., Güntürkün O.B., Bayraktaroğlu A.G. The use of glauconite as a feed additive in broiler nutrition and its effect on growth performance, intestinal histomorphology and biomechanical properties of bones // Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. — 2020. — Vol. 26. — No. 3. — P. 343–349.
 9. Chlorhexidine: technical evaluation report. — 2015. — URL: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Chlorhexidine%20TR%202015.pdf>
 10. Venig S.B., Chernova R.K., Glukhovskoy E.G., Serzhantov V.G., Splyukhin V.P., Perespelova M.A., Selifonova E.I., Naumova G.N., Zakharevich A.M., Selifonov A.A., Kozhevnikov I.O., Scherbakova N.N. Determination of the sorption characteristics of glauconite when extracting the pharmaceutical from aqueous medium // Moscow University Chemistry Bulletin. — 2017. — Vol. 72. — P. 245–250.
 11. Venig S.B., Chernova R.K., Rusanova T.Yu., Mikerov A.N., Shapoval O.G., Serzhantov V.G., Selifonova E.I. Bactericidal properties of composites of methylene blue and cetylpyridinium chloride with glauconite obtained by adsorption method // Russian Journal of Chemistry & Chemical Technology. — 2020. — Vol. 63. — No. 6. — P. 50–57.
 12. Venig S.B., Chernova R.K., Serzhantov V.G., Selifonova E.I., Naumova G.N. Physico-chemical characteristics of glauconite Beloozersky deposits // Asian Journal of Physics. — 2020. — Vol. 29. — No. 3–4. — P. 371–376.
- References**
1. Bel'chinskaya LI, Khodosova NA, Novikova LA, Strel'nikova OYu, Ressler F, Petukhova GA, Zhabin AV. Regulirovaniye sorbtionnykh protsessov na prirodnykh nanoporistyykh alyumosilikatakakh. Fizikokhimiya poverkhnosti i zashchita materialov 2016; 52(4):363–370 (in Russian).
 2. Vzentsev AI, Kormosh YeV, Zdorenko NM, Goldovskaya-Peristaya LF. Adsorbtsionnyye svoystva produktov obogashcheniya prirodnykh montmorillonitrosoderzhashchikh glin. Nauchnyye vedomosti BelGU. Seriya: Yestestvennyye nauki 2011(9):103–109 (in Russian).
 3. Grigor'yeva AI, Vladimirtseva YeL, Sharnina LV, Khabibrakhmanov IR. Effektivnost' izvlecheniya nerastvorimykh krasiteley iz vodnykh dispersiy alyumosilikatami. Vestnik tekhnologicheskogo universiteta 2016; 19(19):116–120 (in Russian).
 4. Dolgikh VT, Dolgikh TI, P'yanova LG, Likholobov VA, Barinov SV, Barakina OV, Gritsenko NS, Tolkach AB. Antimikrobnaya aktivnost' granulirovannykh uglerodnykh sorbentov. Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal 2014; 18(8):788–791 (in Russian).
 5. Kutergin AS, Kutergina IN. Prirodnyye alyumosilikaty dlya ochistki vody ot radionuklidov tekhnogennogo proiskhozhdeniya. Vodoochistka, vodopodgotovka, vodosnabzheniye 2014; 75(3):12–13 (in Russian).
 6. Lamskova MI, Novikov AYe. Vozmozhnosti i perspektivy ochistki stochnykh, oborotnykh i khozyaystvenno-bytovykh vod prirodnymi alyumosilikatami. Izvestiya Volgogradskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta: mezhvuzovskiy sbornik nauchnykh statey. Volgograd, 2014: 77–80 (in Russian).
 7. Martem'yanov DV, Rudmin MA, Kukhar' DA, Saprykin FYe, Slepnov AM, Kazantsev SO, Martem'yanova IV. Issledovaniye sorbtionnykh svoystv obraztsov glaukonita pri izvlechenii imi ionov Zn^{2+} , Cd^{2+} i Cu^{2+} iz vodnykh sred. Teoreticheskiye i prakticheskiye problemy razvitiya sovremennoy nauki: materialy XV Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, Makhachkala, 30 noyabrya 2017 goda. Makhachkala: Obshchestvo s ogranichennoy otvetstvennost'yu «Aprobatsiya», 2017: 13–14 (in Russian).
 8. Aydin ÖD, Yildiz G, Güntürkün OB, Bayraktaroğlu AG. The use of glauconite as a feed additive in broiler nutrition and its effect on growth performance, intestinal histomorphology and biomechanical properties of bones. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2020; 26(3):343–349.
 9. Chlorhexidine: technical evaluation report. 2015. URL: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Chlorhexidine%20TR%202015.pdf>
 10. Venig SB, Chernova RK, Glukhovskoy EG, Serzhantov VG, Splyukhin VP, Perespelova MA, Selifonova EI, Naumova GN, Zakharevich AM, Selifonov AA, Kozhevnikov IO, Scherbakova NN. Determination of the sorption characteristics of glauconite when extracting the pharmaceutical from aqueous medium. Moscow University Chemistry Bulletin 2017; 72:245–250.
 11. Venig SB, Chernova RK, Rusanova TYu, Mikerov AN, Shapoval OG, Serzhantov VG, Selifonova EI. Bactericidal properties of composites of methylene blue and cetylpyridinium chloride with glauconite obtained by adsorption method. Russian Journal of Chemistry & Chemical Technology 2020; 63(6):50–57.
 12. Venig SB, Chernova RK, Serzhantov VG, Selifonova EI, Naumova GN. Physico-chemical characteristics of glauconite Beloozersky deposits. Asian Journal of Physics 2020; 29(3–4):371–376.

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF THE COMPOSITE BASED ON NATURAL ALUMINOSILICATE AND CHLORHEXIDINE

S.B. VENIG¹, **R.K. CHERNOVA**¹, V.G. SERZHANTOV¹, T.YU. RUSANOVA¹, A.N. MIKEROV²,
O.G. SHAPOVAL², E.I. SELIFONOVA¹

¹ *Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky;*

² *Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov*

Glaucanite is one of the most used natural sorbents, including creation of composites with antimicrobial properties. Chlorhexidine bigluconate was absorbed on glaucanite by the static method at the room temperature. Antibacterial activity of the composite was determined against strains of the species *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* FDA 209P. The strains were cultivated in the adaptation phase in the expected subinhibitory concentrations of chlorhexidine, created by the same composite weights in the large and small volume of meat-pepton broth. The glaucanite was assessed to be a good sorbent for chlorhexidine bigluconate, the sorption of glaucanite to chlorhexidine bigluconate was found to be $1,2 \times 10^{-6}$ mol/g and the extraction rate was 85%. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the chlorhexidine bigluconate is 15 µg/ml for *P. aeruginosa* ATCC 27835 and 3 µg/ml for *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* FDA 209P. During cultivation of the experimental strains in the composite weights, equivalent to MIC of chlorhexidine bigluconate, bactericidal activity of the absorbed chlorhexidine was decreased.

Keywords: chlorhexidine, glaucanite, composite, antibacterial activity.

Address:

Venig S.B.

Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Dean of the Faculty of Nano- and Biomedical Technologies, Professor at the Department of Materials Science, Technology and Quality Management, Saratov National State University named after N.G. Chernyshevsky

E-mail: wenigsb@mail.ru

Для цитирования:

С.Б. Вениг, **Р.К. Чернова**, В.Г. Сержантов, Т.Ю. Русанова, А.Н. Микеров, О.Г. Шаповал, Е.И. Селифонова. Антибактериальные свойства композита на основе природного алюмосиликата и хлоргексидина. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):12–17.

For citation:

S.B. Venig, **R.K. Chernova**, V.G. Serzhantov, T.Yu. Rusanova, A.N. Mikerov, O.G. Shapoval, E.I. Selifonova. Antibacterial properties of the composite based on natural aluminosilicate and chlorhexidine. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):12–17 (in Russian).

ВЛИЯНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ НА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БАКТЕРИЙ ВИДА *PROTEUS MIRABILIS*

А.А. ВАКАРИНА^{1*}, А.В. АЛЕШКИН², Е.О. РУБАЛЬСКИЙ², Т.Ф. СТЕПАНОВА¹,
И.А. КИСЕЛЕВА², Л.В. КАТАЕВА¹, Э.Р. ЗУЛЬКАРНЕЕВ^{2,3}, Р.С. КАЛЕНДР²

¹ ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии»
Роспотребнадзора, Тюмень;

² ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора,

³ ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, Москва

Изучено влияние трех вирулентных фагов на антибиотикочувствительность бактериальных штаммов *Proteus mirabilis*. Высокий титр бактериофагов и их литическая способность указывали на активный процесс взаимодействия вирусов и бактерий, а также на хорошую чувствительность микроорганизмов к бактериофагам. Совместное культивирование специфических бактериофагов и бактерий проводилось в течение суток с дальнейшим сравнением их чувствительности к антибиотикам до и после взаимодействия. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют об отсутствии влияния вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий вида *P. mirabilis*. Это дает возможность рекомендовать проведение терапии бактериальных инфекций вирулентными бактериофагами совместно с антибиотиками.

Ключевые слова: антибиотикочувствительность, бактерии, вирулентные бактериофаги, антибактериальные препараты.

Введение

Всемирная организация здравоохранения в 2015 г. признала глобальной проблемой распространения устойчивости бактерий к противомикробным препаратам. В последние годы в качестве альтернативы стали активно рассматривать бактериофаги как в монотерапии, так и в комбинации с антибиотиками. В настоящее время нет однозначного утверждения, что комбинированное использование фагов и антибиотиков будет полезным. В случаях, когда антибиотики мешают клеткам хозяина поддерживать репликацию фагов, комбинированное использование предположительно снижает эффективность фагового лечения и терапии в целом [6, 9]. Однако в ряде исследований, в которых фаги и антибиотики применялись одновременно, показано, что данное сочетание улучшает результат терапии [3, 12, 18].

© 2021 г. Вакарina А.А., Алешкин А.В., Рубальский Е.О., Степанова Т.Ф., Киселева И.А., Катаева Л.В., Зулкарнеев Э.Р., Календр Р.С.

* Автор для переписки:

Вакарina Арина Александровна
младший научный сотрудник бактериологической лаборатории,
ФБУН Тюменского НИИКИП Роспотребнадзора
E-mail: VakarinaA.A@Tniikip.rosпотребнадзор.ru

Изучение цикла взаимодействия вируса и бактерии обусловило деление бактериофагов на два типа: вирулентные и умеренные. Бактериофаги, способные размножаться исключительно в литическом цикле с разрушением бактериальной клетки, относят к вирулентным. Фаги, способные к сохранению жизнеспособности бактерий и передачи ей своего генома, называют умеренными [2]. Модификация свойств лизогенной бактерии генами профага может обеспечивать устойчивость к токсическим веществам, способствовать продукции факторов патогенности, выработке ферментов, формированию устойчивости к ряду фагов, уходу от иммунного ответа макроорганизма, изменению морфологических признаков микроорганизмов; кроме того, фаги способны индуцировать точечные мутации в генах бактерий. Показано, что в стационарных условиях взаимодействия возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и умеренных бактериофагов могут сформироваться линии штаммов, обладающие множественной антибиотикорезистентностью [2, 8].

К сожалению, геном вирулентных фагов не изучен полностью. Нерасшифрованные гены могут кодировать различные функции и участвовать в выработке вспомогательных белков, которые могут оказывать воздействие на физиологию бактерий [10].

Любое стрессовое воздействие может приводить к изменению жизнедеятельности бактериальной клетки. Во-первых, смена благоприятных условий на менее благоприятные вызывает переход популяции к несбалансированному росту. Во-вторых, сложная система, состоящая из множества сенсорных компонентов генных регуляторных сетей, воспринимает сигналы среды и реагирует на них, запуская те или иные механизмы физиологической адаптации [4]. Оба этих процесса под воздействием бактериофага приводят к физиологической гетерогенности популяции бактерий и дают возможность изучить экосистему «вирулентный бактериофаг-бактерия».

Цель работы — изучить влияние вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий вида *Proteus mirabilis*.

Материалы и методы

Бактериофаги. Изучение влияния вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность штаммов *P. mirabilis* проводилось с использованием 2 фагов Р16-2535, 2207-№ 35 (accession GenBank MN840486, MN840487) и 1 бактериофага PRO-1 из рабочей коллекции ФНМЦ по изучению и идентификации бактериофагов, организованного на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. В мягком агаре фаги образовывали круглые колонии, прозрачные, четкие, ровные, с ореолом, диаметром 3 мм. Титр фагов составлял не менее 10^8 БОЕ/мл по методу Грациа [1].

Бактериофаг PRO-1 был протестирован на предмет отсутствия известных интеграз, гомологичных интегразам умеренных фагов PsP3, P2, Kp6, P21, Lambda, при помощи специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР). Геномы протейных бактериофагов Р16-2535 и 2207-№ 35 были отсекувенированы на платформе нанопорового секвенирования MinION (Oxford Nanopore, Великобритания). Для проведения обоих методов фаголизат с высоким титром бактериофага пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм с последующей обработкой ДНКазой I. Затем проводили выделение ДНК при помощи набора К-Сорб (ООО «НПФ Синтол», Россия) согласно протоколу производителя [16].

Реакцию ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия) по методам, изложенным ранее, с последующей детекцией специфического продукта методом горизонтального гелеэлектрофореза [11, 16].

Секвенирование осуществляли с использованием наборов реагентов Rapid Sequencing Kit и Rapid

Barcoding Kit (Oxford Nanopore, Великобритания) согласно протоколу производителя. Биоинформатический анализ результатов нанопорового секвенирования проводили при помощи следующего программного обеспечения. Распознавание оснований реализовывали с применением программного обеспечения Cury с последующим удалением адаптерных последовательностей из полученных прочтений при помощи программного обеспечения Porechop [19]. Далее выполняли фильтрацию качества прочтений программным обеспечением NanoFilt [13], сборку геномов de novo программным обеспечением Canu v.1.9 [14, 15] и выравнивание отфильтрованных прочтений на собранную de novo последовательность в программном обеспечении UGENE v33 (Unipro, Россия) по алгоритму BWA-MEM. Аннотирование геномов осуществляли при помощи программного средства Prokka [17]. Все исследуемые штаммы протейных бактериофагов принадлежали к семейству *Siphoviridae*. Было определено более точное систематическое положение фага 2207 № 35 — род *Gorganvirus*.

Штаммы. Бактериальные культуры *P. mirabilis* были выделены из клинического материала пациентов акушерского стационара города Тюмени. Видовую идентификацию микроорганизмов проводили с помощью настольного времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией MALDI-TOF MS (Bruker, Германия) по белковым спектрам и оценивали высоким показателем достоверности (score более 2).

Метод исследования литических свойств бактериофагов. Литические свойства вирулентных бактериофагов определяли методом постановки spot-test'a. Исследуемый штамм бактерий равномерно наносили на поверхность чашки Петри с хорошо подсушенной питательной средой Мюллер — Хинтон (Conda, Испания). Дозатором на поверхность среды с культурой наносили одну каплю бактериофага. После подсыхания капли фага чашки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Для проведения экспериментальной работы отбирались бактериальные культуры, литическая активность фагов к которым оценивалась по пятибальной системе на три креста (+++) и характеризовалась как зона лизиса с единичными колониями вторичного роста [8].

Определение антибиотикочувствительности бактериальных культур. Постановка антибиотикограмм выполнялась индикаторными дисками с противомикробными препаратами производства ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [5]. Определение чувствительности штаммов *P. mirabilis* осуществлялось

к ципрофлоксацину 5 мкг, серия 030320; амикацину 30 мкг, серия 070720; амоксициллин/клавулановой кислоте 20/10 мкг, серия 070720; цефтазидиму 10 мкг, серия 030320; цефотаксиму 5 мкг, серия 030320; ампициллину 10 мкг, серия 030320; норфлоксацину 10 мкг, серия 070720; меропенему 10 мкг, серия 030320; имипенему 10 мкг, серия 030320; тобрамицину 10 мкг, серия 030320. Контроль качества дисков АБП (антибактериальные препараты) проводился коллекционными штаммами *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Из суточных культур микроорганизмов с помощью денситометра готовили бактериальную суспензию 0,5 ЕД по МакФарланду ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Инокулят наносили тампоном на агар Мюллер – Хинтон в течение 15 минут после приготовления. Не позднее этого же времени на поверхность питательной среды раскладывали диски с АБП. Определение чувствительности микроорганизмов к АБП выполняли диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 и рекомендациям Европейского комитета (EUCAST) [5, 7].

Совместное культивирование микроорганизмов с бактериофагами осуществляли в жидкой питательной среде. Для этого в стерильную пробирку с 4,5 мл питательного бульона добавляли 200 мкл бактериальной суспензии с мутностью 0,5 ЕД по МакФарланду ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), 200 мкл бактериофага с титром 10^8 БОЕ/мл, перемешивали, вращая пробирку между ладонями, и инкубировали в течение 18–24 часов при 37 °С. После суточного взаимодействия бактерий с бактериофагом из всех пробирок петлей проводили высеивание на плотную питательную среду Мюллер – Хинтон и выполняли повторную идентификацию выросших единичных колоний микроорганизмов. Далее из этих бактерий вновь готовили суспензию мутностью 0,5 ЕД по МакФарланду и повторно исследовали на чувствительность к АБП. Интерпретацию значений диаметров зон задержки роста микроорганизмов при определении антибиотико-чувствительности проводили в соответствии с действующими нормативными документами [5, 7] и инструкциями по применению наборов дисков, предложенными производителем.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics Версия 22.0. Проверку гипотезы нормальности распределения осуществляли с помощью критериев Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилка. Кроме того, для проверки распределения использовались квантильные диаграммы. Для непре-

рывных данных рассчитывали медианы показателей (Me) и интерквартильные размахи Q [Q1–Q3]. Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий знаковых рангов Уилкоксона для связанных выборок, так как переменные не подчинялись нормальному распределению. Различия результатов считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование методом spot-test'a выявило штаммы *P. mirabilis*, чувствительные к протейным бактериофагам (табл. 1).

Таблица 1

Чувствительность штаммов *P. mirabilis* в отношении вирулентных бактериофагов, участвующих в экспериментальной работе

Наименование бактериофага <i>P. mirabilis</i>	Номер штамма <i>P. mirabilis</i>	Оценка литической активности бактериофага
P16-2535	2111	+++
	2482	+++
	2350	+++
	2762	+++
	2848	+++
PRO-1	3299	+++
	2133	+++
	2906	+++
	2394	+++
	2243	+++
2207-№ 35	2111	+++

Примечание: +++ – зона лизиса с единичными колониями вторичного роста

В ходе эксперимента трижды в трехкратной повторности проведено исследование чувствительности отобранных штаммов *P. mirabilis* к каждому АБП до и после инкубирования со специфическим вирулентным бактериофагом.

Интерпретация значений диаметров зон задержки роста бактерий при определении чувствительности к АБП представлена в таблице 2.

Полученные данные свидетельствовали о том, что после совместного культивирования штаммов *P. mirabilis* с бактериофагами значения диаметров зон подавления роста бактерий под влиянием АБП находились в пределах своей категории: «чувствительный», «умеренно-резистентный» и «устойчивый».

Чувствительность бактерий *P. mirabilis* к АБП до и после культивирования с бактериофагами

Антибиотики	Чувствительность культур до и после взаимодействия с фагом:							
	№ штамма	P16-2535		2207-№ 35		№ штамма	PRO-1	
		до	после	до	после		до	после
ципрофлоксацин	2111	R	R	R	R	3299	R	R
	2482	S	S	-	-	2133	R	R
	2350	R	R	-	-	2906	R	R
	2762	S	S	-	-	2394	R	R
	2848	R	R	-	-	2243	R	R
амикацин	2111	R	R	S	S	3299	S	S
	2482	S	S	-	-	2133	S	S
	2350	S	S	-	-	2906	S	S
	2762	S	S	-	-	2394	S	S
	2848	S	S	-	-	2243	R	R
имипенем	2111	S	S	S	S	3299	S	S
	2482	S	S	-	-	2133	S	S
	2350	S	S	-	-	2906	S	S
	2762	S	S	-	-	2394	S	S
	2848	S	S	-	-	2243	S	S
меропенем	2111	S	S	S	S	3299	S	S
	2482	S	S	-	-	2133	S	S
	2350	S	S	-	-	2906	S	S
	2762	S	S	-	-	2394	S	S
	2848	S	S	-	-	2243	S	S
норфлоксацин	2111	R	R	R	R	3299	R	R
	2482	S	S	-	-	2133	R	R
	2350	R	R	-	-	2906	R	R
	2762	S	S	-	-	2394	R	R
	2848	R	R	-	-	2243	R	R
ампициллин	2111	R	R	R	R	3299	R	R
	2482	S	S	-	-	2133	R	R
	2350	R	R	-	-	2906	R	R
	2762	S	S	-	-	2394	R	R
	2848	R	R	-	-	2243	R	R
цефтазидим	2111	I/S	I/S	I/R	I/R	3299	S	S
	2482	S	S	-	-	2133	I/R	I/R
	2350	I/R	I/R	-	-	2906	I	I
	2762	S	S	-	-	2394	I/R	I/R
	2848	I/S	I/S	-	-	2243	I/S	I/S
цефотаксим	2111	I/R	I/R	I/R	I/R	3299	I/R	I/R
	2482	S	S	-	-	2133	R	R
	2350	R	R	-	-	2906	R	R
	2762	S	S	-	-	2394	R	R
	2848	R	R	-	-	2243	R	R
амоксциллин/клавулановая кислота	2111	R	R	R	R	3299	R	R
	2482	S	S	-	-	2133	R	R
	2350	R	R	-	-	2906	R	R
	2762	S	S	-	-	2394	R	R
	2848	R	R	-	-	2243	S	S
тобрамицин	2111	R	R	R	R	3299	R	R
	2482	S	S	-	-	2133	R	R
	2350	R/I	I/R	-	-	2906	R	R
	2762	S	S	-	-	2394	R	R
	2848	R	R	-	-	2243	R	R

Примечание: R – устойчивый, I – умеренно-резистентный, S – чувствительный штамм, АБП – антибактериальные препараты

Для проверки переменных на нормальность распределения использовали критерии Шапиро – Уилка ($n < 50$) и Колмогорова – Смирнова ($n > 50$). Было установлено отсутствие нормального распределения изучаемых показателей ($\rho < 0,05$), что подтверждается квантильными диаграммами.

Количественные признаки различий зон подавления роста штаммов *P. mirabilis* до и после взаимодействия с вирулентными бактериофагами представлены в виде медиан, верхнего и нижнего квартилей Q1 и Q3 (табл. 3, 4).

Таблица 3

Влияние бактериофагов на задержку роста *P. mirabilis* по всем группам изучаемых антибиотиков

Фаги	Диаметры зон задержки роста бактерий под влиянием АБП до и после взаимодействия с фагами, Ме [Q1–Q3] (по всем изучаемым антибиотикам)		ρ
	до	после	
P16-2532	21,1 [0,0–30,4]	21,6 [1,8–30,0]	0,232
PRO-1	6,3 [0,0–21,4]	5,8 [0,0–21,12]	0,087
2207-№ 35	16,3 [0,0–20,0]	15,6 [0,0–20,6]	0,248

Таблица 4

Анализ влияния вирулентных бактериофагов на изменение диаметров зон задержки роста бактерий *P. mirabilis* под воздействием АБП

Антибиотики	Диаметры зон задержки роста бактерий под влиянием АБП до и после взаимодействия с фагами, Ме [Q1–Q3]		ρ
	до	после	
Ципрофлоксацин	0,00 [0,0–33,7]	0,00 [0,0–34,4]	0,180
Амикацин	20,7 [1,1–26,0]	20,8 [1,3–25,4]	0,173
Имипенем	30,6 [2,6–30,8]	30,8 [20,3–33,1]	0,225
Меропенем	30,9 [29,2–32,8]	30,0 [29,0–31,1]	0,225
Норфлоксацин	30,1 [14,2–31,2]	30,6 [14,3–32,3]	0,273
Ампициллин	0,00 [0,0–29,9]	0,00 [0,0–30,6]	0,180
Цефтазидим	0,00 [9,0–25,5]	0,00 [0,0–26,4]	0,180
Цефотаксим	24,2 [9,0–29,5]	23,1 [8,6–30,6]	0,715
Амоксициллин/клавулановая кислота	18,6 [6,6–26,6]	18,7 [7,2–27,1]	0,343
Тобрамицин	5,6 [2,6–22,2]	10,0 [0,9–22,0]	1,00

Проведенный анализ влияния бактериофагов на антибиотикочувствительность группы восприимчивых штаммов *P. mirabilis*, а также в разрезе каждого вида антибактериального средства установил отсутствие статистически значимых различий.

Статистическая оценка диаметров зон подавления роста микроорганизмов до и после взаимодействия с бак-

териофагами по каждому штамму бактерий проводилась непараметрическим критерием Уилкоксона для связанных выборок. Рассмотрение влияния специфического бактериофага на изучаемые бактерии *P. mirabilis* показало, что значения чувствительности штаммов к АБП до и после сокультивирования с вирулентными бактериофагами не обладали статистической значимостью (табл. 5).

Таблица 5

Статистическая значимость зоны задержки роста бактерий *P. mirabilis* до и после взаимодействия с вирулентными бактериофагами (критерий Уилкоксона, ρ)

Бактериофаг	P16-2532					2207-№ 35	
	Штамм	2111	2482	2350	2762	2848	2111
Ципрофлоксацин		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Амикацин		0,317	0,785	1,000	0,109	0,285	0,102
Имипенем		0,109	1,000	0,414	0,593	1,000	0,593
Меропенем		0,109	0,109	0,593	0,593	1,000	1,000

Норфлоксацин	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Ампициллин	1,000	0,785	1,000	0,285	1,000	1,000
Цефтазидим	0,593	0,180	0,180	0,593	1,000	1,000
Цефотаксим	1,000	0,276	0,180	1,000	0,655	0,285
Амоксициллин/ клавулановая кислота	1,000	0,655	1,000	0,109	1,000	0,285
Тобрамицин	1,000	0,285	0,593	0,447	0,655	1,000
Бактериофаг	PRO-1					
Штамм	3299	2133	2906	2394	2243	-
Ципрофлоксацин	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
Амикацин	1,000	0,785	1,000	0,785	0,655	-
Имипенем	0,109	0,109	0,109	0,593	0,109	-
Меропенем	0,285	0,593	1,000	0,180	0,109	-
Норфлоксацин	1,000	0,655	1,000	1,000	1,000	-
Ампициллин	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
Цефтазидим	0,285	0,180	0,317	0,285	0,285	-
Цефотаксим	0,593	0,180	0,593	0,655	0,593	-
Амоксициллин/ клавулановая кислота	1,000	0,655	1,000	0,593	0,180	-
Тобрамицин	1,000	1,000	0,785	0,180	1,000	-

Заключение

Изучение экосистемы с участием бактерий *P. mirabilis* и вирулентных бактериофагов выявило отсутствие фагового влияния на антибиотикочувствительность микроорганизмов. Это дает возможность рекомендовать антибиотикотерапию в комбинации с вирулентными бактериофагами.

Литература

1. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Алейкин А.В. и др. Разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов (биопроцессинг). — Ульяновск, 2019. — 450 с.
2. Летаров А.В. Современные концепции биологии бактериофагов. — М.: ТД «ДеЛи», 2015. — 384 с.
3. Летифов Г.М., Чеботарева Ю.Ю., Костоева Э.А. Особенности комплексного лечения вульвовагинита у девочек-дошкольниц с различными формами пиелонефрита // Нефрология. — 2017. — Т. 21. — № 5. — С. 59–64.
4. Магданова Л.А., Голясная Н.В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции // Микробиология. — 2013. — Т. 82. — № 1. — С. 3–13.
5. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Методические указания. — М.: Федерал. центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. — 91 с.
6. Падруль М.М., Кобаидзе Е.Г., Олина А.А., Садыкова Г.К. «Ренессанс» фаготерапии воспалительных процессов // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 1. — С. 1356–1370.
7. Рекомендации Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST). Версия 10.0. — URL: <http://www.eucast.org> (дата обращения: 10.05.2020).
8. Федеральные клинические (методические) рекомендации. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. — М., 2014. — 54 с.
9. Abedon S.T. Phage-antibiotic combination treatments: Antagonistic impacts of antibiotics on the pharmacodynamics of phage therapy? // Antibiotics. — 2019. — Vol. 8(4). — e182. doi.org/10.3390/antibiotics8040182.
10. Altamirano F.L.G., Barr J.J. Phage therapy in the postantibiotic era // Clin. Microbiol. Rev. — 2019. — Vol. 32(2). — e00066-18. doi: 10.1128/CMR.00066-18.
11. Balding C., Bromley S.A., Pickup R.W., Saunders J.R. Diversity of phage integrases in *Enterobacteriaceae*: development of markers for environmental analysis of temperate phages // Environmental Microbiology. — 2005. — Vol. 7. — P. 1558–1567.

12. Chan B.K., Siström M., Wertz J.E., Kortright K.E., Narayan D., Turner P.E. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa* // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. doi: 10.1038/srep26717.
13. De Coster W., D’Hert S., Schultz D.T., Cruts M., Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data // *Bioinformatics.* – 2018. – Vol. 34(15). – P. 2666–2669.
14. Koren S., Rhie A., Walenz B., et al. De novo assembly of haplotype-resolved genomes with trio binning // *Nature Biotechnology.* – 2018. – Vol. 36. – P. 1174–1182. doi: 10.1038/nbt.4277.
15. Koren S., Walenz B., Berlin K., Miller J.R., Bergman N.H., Phillippy A.M. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation // *Genome Research.* – 2017. – Vol. 27. – P. 722–736.
16. Rubalskii E.O., Aleshkin A.V., Afanasiev S.S., et al. Integrative approach for control of temperate bacteriophages in phage-based products // *Астраханский медицинский журнал.* – 2017. – Vol. 12. – No. 3. – P. 56–63.
17. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // *Bioinformatics.* – 2014. – Vol. 30(14). – P. 2068–2069.
18. Torres-Barceló C., Arias-Sánchez F.I., Vasse M., Ramsayer J., Kaltz O., Hochberg M.E. A window of opportunity to control the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* combining antibiotics and phages // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9(9). doi.org/10.1371/journal.pone.0106628.
19. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing // *Microb. Genom.* – 2017. – Vol. 3(10). – e000132. doi:10.1099/mgen.0.000132.
- ukazaniya. Moscow: Federal. tsentr gossanepidnadzora Minzdrava Rossii, 2004: 91 (in Russian).
6. Padrul’ MM, Kobaidze YeG, Olina AA, Sadykova GK. «Renessans» fagoterapii vospalitel’nykh protsessov. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* 2015; 1:1356–1370. (in Russian).
7. Rekomendatsii Yevropeyskogo komiteta po opredeleniyu chuvstvitel’nosti k antimikrobnym preparatam (EUCAST). Versiya 10.0. URL: <http://www.eucast.org> (data obrashcheniya: 10.05.2020). (in Russian).
8. Federal’nyye klinicheskiye (metodicheskiye) rekomendatsii. Ratsional’noye primeneniye bakteriofagov v lechebnoy i protivoepidemicheskoy praktike. Moscow, 2014: 54 (in Russian).
9. Abedon ST. Phage-antibiotic combination treatments: Antagonistic impacts of antibiotics on the pharmacodynamics of phage therapy?. *Antibiotics* 2019; 8(4):e182. doi.org/10.3390/antibiotics8040182.
10. Altamirano FLG, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin. Microbiol. Rev* 2019; 32(2):e00066-18. doi: 10.1128/CMR.00066-18.
11. Balding C, Bromley SA, Pickup RW, Saunders JR. Diversity of phage integrases in Enterobacteriaceae: development of markers for environmental analysis of temperate phages. *Environmental Microbiology* 2005; 7:1558–1567.
12. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 2016; 6. doi: 10.1038/srep26717.
13. De Coster W, D’Hert S, Schultz DT, Cruts M, Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* 2018; 34(15):2666–2669.
14. Koren S, Rhie A, Walenz B, et al. De novo assembly of haplotype-resolved genomes with trio binning. *Nature Biotechnology* 2018; 36:1174–1182. doi: 10.1038/nbt.4277.
15. Koren S, Walenz B, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research* 2017; 27:722–736.
16. Rubalskii EO, Aleshkin AV, Afanasiev SS, et al. Integrative approach for control of temperate bacteriophages in phage-based products. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal* 2017; 12(3):56–63.
17. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; 30(14):2068–2069.
18. Torres-Barceló C, Arias-Sánchez FI, Vasse M, Ramsayer J, Kaltz O, Hochberg ME. A window of opportunity to control the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* combining antibiotics and phages. *PLoS One* 2014; 9(9). doi.org/10.1371/journal.pone.0106628.
19. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microb. Genom* 2017; 3(10):e000132. doi:10.1099/mgen.0.000132.

References:

1. Vasil’yev DA, Feoktistova NA, Aleshkin AV i dr. Razrabotka biotekhnologicheskikh parametrov sozdaniya bakteriofagovykh biopreparatov dlya dekontaminatsii mikroflory, vyzyvayushchey porchu pishchevogo syr’ya zhivotnogo proiskhozhdeniya i myasnykh, rybnykh, molochnykh produktov (bioprotsessing). Ul’yanovsk, 2019: 450 (in Russian).
2. Letarov AV. *Sovremennyye kontseptsii biologii bakteriofagov.* Moscow: TD «DeLi», 2015: 384 (in Russian).
3. Letifov GM, Chebotareva YuYu, Kostoyeva ZA. Osobennosti kompleksnogo lecheniya vul’vovaginita u devochek-doshkol’nits s razlichnymi formami piyelonefrita // *Neфроlogiya* 2017; 21(5):59–64 (in Russian).
4. Magdanova LA, Golyasnaya NV. Geterogennost’ kak adaptivnoye svoystvo bakterial’noy populatsii // *Mikrobiologiya* 2013; 82(1):3–13 (in Russian).
5. MUK 4.2.1890-04 «Opredeleniye chuvstvitel’nosti mikroorganizmov k antibakterial’nym preparatam». Metodicheskiye

INFLUENCE OF VIRULENT BACTERIOPHAGES ON ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *PROTEUS MIRABILIS* SPECIES

A.A. VAKARINA¹, A.V. ALESHKIN², E.O. RUBALSKY², T.F. STEPANOVA¹, I.A. KISELEVA²,
L.V. KATAEVA¹, E.R. ZULKARNEEV^{2,3}, R.S. KALENDR²

¹ Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology of the Rospotrebnadzor, Tyumen;

² Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky
of the Rospotrebnadzor,

³ Anti-Plague Center of the Rospotrebnadzor, Moscow

The effect of 3 of the virulent phages on the antibiotic sensitivity of bacterial strains of *Proteus mirabilis* was studied. The high titer of bacteriophages and their lithic ability indicated the active process of the interaction of viruses and bacteria, as well as about the good sensitivity of microorganisms to bacteriophages. The joint cultivation of specific bacteriophages and bacteria was carried out during the day with a further comparison of their sensitivity to antibiotics before and after interaction. The results of experimental studies indicate the absence of influence of virulent bacteriophages on the antibiotic sensitivity of the bacteria of the *P. mirabilis*. This makes it possible to recommend to conduct therapy of bacterial infections with virulent bacteriophages together with antibiotics.

Keywords: antibiotic sensitivity, bacteria, virulent bacteriophages, antibacterial drugs.

Address:

Vakarina A.A., Junior Researcher
Bacteriological Laboratory, Tyumen Research Institute
of Regional Infectious Pathology of the Rospotrebnadzor
E-mail: VakarinaA.A@Tniikip.rospotrebnadzor.ru

Для цитирования:

Вакарина А.А., Алешкин А.В., Рубальский Е.О., Степанова Т.Ф., Киселева И.А., Катаева Л.В., Зулкарнеев Э.Р., Календр Р.С. Влияние вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий вида *Proteus mirabilis*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):18–25.

For citation:

Vakarina A.A., Aleshkin A.V., Rubalsky E.O., Stepanova T.F., Kiseleva I.A., Kataeva L.V., Zulkarneev E.R., Kalendr R.S. Influence of virulent bacteriophages on antibiotic sensitivity of *Proteus mirabilis* species. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):18–25 (in Russian).

МЕМБРАННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОИЗВОДСТВАХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ВЫПУСКАЕМЫХ ФКУЗ РОСНИПЧИ «МИКРОБ» РОСПОТРЕБНАДЗОРА (ПОДВЕДЕНИЕ ИТОГОВ ИССЛЕДОВАНИЙ)

А.В. КОМИССАРОВ*, Е.Г. АБРАМОВА, О.А. ВОЛОХ, М.В. АНТОНЫЧЕВА,
С.В. ГЕНЕРАЛОВ, И.М. ЖУЛИДОВ, Л.В. САВИЦКАЯ, А.Г. СЕЛЕЗНЕВА, А.Ю. УЛЬЯНОВ,
К.И. ХОЛМАТОВ, Н.И. ВАХРУШИНА, Д.Н. БИБИКОВ, А.К. НИКИФОРОВ

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

В ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» выполнены теоретические и экспериментальные исследования по обоснованию использования мембранных технологий на различных этапах (фильтрация от примесей, фракционирование и концентрирование) в производстве иммунобиологических лекарственных препаратов, позволяющих повысить эффективность и производительность процессов. Приведен опыт применения мембранных технологий при очистке воды на этапе приготовления питательных сред для глубинного культивирования микроорганизмов. Обоснована целесообразность метода тангенциальной ультрафильтрации для концентрирования культуральной суспензии *vigus fixe* штамма «Москва 3253_{Vero}». Показано, что оптимальным является применение мембран с номинальной отсечкой, не превышающей 300 кДа, при давлении $0,25 \pm 0,01$ МПа. Методом ИФА подтверждено, что концентрирование вирусного урожая позволило увеличить концентрацию вируса бешенства в культуральном рабическом антигене до уровня традиционно используемого органо-тканевого антигена. В технологический процесс производства холерной химической вакцины внедрен ряд фильтрационных процедур. Концентрирование О-антигена *Vibrio cholerae* М41 серовара Огава ультрафильтрацией в тангенциальном потоке жидкости на плоскорамных элементах дало возможность увеличить выход целевого продукта в 1,5 раза. Разработана технология концентрирования протективных антигенов *V. cholerae* 569В серовара Инаба этим же способом, что дало возможность уменьшения сернокислого аммония в 10 раз и снизить потери в 1,2 раза. Использование мембранных модулей 500 и 50 кДа при концентрировании иммуногенов холерной химической вакцины, продуцируемых штаммами холерных вибрионов М41 серовара Огава и 569В серовара Инаба, а также проведение процесса при экспериментально обоснованных барометрических и тепловых параметрах открывает возможность обрабатывать производственные объемы продуктов за 5–6 часов. Обосновано использование ультрафильтрации в тангенциальном потоке жидкости на плоскорамных элементах для деминерализации протективных антигенов холерной химической вакцины, что позволяет проводить процесс в контролируемых условиях и уменьшить его время с 2–3 дней до 2–3 часов. Разработана технология ультрафильтрационного фракционирования холерогена-анатоксина штамма холерного вибриона 569В Инаба из сепарированной культуральной жидкости. Применение данной технологии позволило сократить продолжительность технологических процедур практически на 60 ч. Разработанные ультрафильтрационные процессы внедрены в промышленную технологию производства холерной химической вакцины. Экономическая эффективность производства только за счет уменьшения количества сульфата аммония, используемого для выделения антигенов составляет до 800000 рублей (в ценах 2020 года). Оценены следующие методы концентрирования биомассы *Francisella tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ с целью использования в производстве живой туляремийной вакцины: седиментация, центрифугирование и тангенциальная фильтрация. Сравнительное изучение временных характеристик процессов, свойств полученных концентратов выявило преимущественность применения метода тангенциальной фильтрации.

Ключевые слова: баромембранные процессы, иммунобиологический лекарственный препарат, питательные среды, антирабический иммуноглобулин, холерная химическая вакцина, живая туляремийная вакцина, мембранные методы разделения, тангенциальная фильтрация, патронный мембранный фильтроэлемент.

© 2021 г. Комиссаров А.В., Абрамова Е.Г., Волох О.А., Антонычева М.В., Генералов С.В., Жулидов И.М., Савицкая Л.В., Селезнева А.Г., Ульянов А.Ю., Холматов К.И., Вахрушина Н.И., Бибииков Д.Н., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

Комиссаров Александр Владимирович
докт. биол. наук, проф., главный научный сотрудник
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора
E-mail: Komissarov-9@yandex.ru

Введение

Мембранная фильтрация — широко распространенный производственный процесс, успешно используемый в различных целях в фармацевтической промышленности. Это связано с технологической простотой, высокой эффективностью, малой материало- и энергоемкостью мембранных процессов. Однако каждый раз необходимо обосновывать выбор рабочих характеристик мембранного фильтра с учетом условий конкретной решаемой задачи [10].

Одним из ключевых элементов для обеспечения качества фармацевтической продукции является очищенная вода, которая используется на всех этапах производства, в том числе при приготовлении питательных сред. Требования к ее качеству сформулированы в Государственной Фармакопее XIV издания. Система водоподготовки для производства лекарственных средств, в первую очередь, зависит от состава исходной водопроводной воды и требований к воде очищенной по ФС.2.2.0020.18 [13]. Требования к качеству очищенной воды и удельный расход на единицу выпускаемой продукции даже при выполнении аналогичных технологических процессов значительно отличаются. По этой причине решение задачи по выбору установки, комбинации фильтрующих элементов в системе очистки водопроводной воды представляется актуальным для каждого этапа производства. Ранее использовали дистиллированную воду, получаемую на паровом дистилляторе ПД-200. Дистиллированная вода считается оптимальным вариантом для приготовления питательных сред [17]. С точки зрения экономической целесообразности дистилляция является дорогостоящим методом получения очищенной воды. Из 19 л исходной питьевой воды получают 1 л очищенной. На сегодняшний день актуальны более перспективные и экономичные методы приготовления очищенной воды. Например, комбинация методов обратного осмоса и ионного обмена. Установки на основе этих методов получили огромное развитие и энергетически выгодны и безопасны. Для решения технологической производственной задачи по получению воды очищенной, используемой для приготовления питательных сред, применяемых в производстве лекарственных средств, необходимо было оценить качество исходной воды, потребности в воде очищенной (л/ч), выбрать фильтрационные материалы, в том числе мембранные, для поэтапной очистки воды и отработать режим эксплуатации и санации установки.

В процессе фильтрации бактериальной питательной среды решаются одновременно несколько техноло-

гических задач: удаление нерастворимых частиц и осветление, а иногда и стерилизация. Правильное проведение микро- и ультрафильтрации обеспечивает максимальное освобождение растворов от механических включений и микроорганизмов и повышает надежность последующей стерилизации [17]. Мембранные фильтрующие элементы патронного типа предназначены для проведения промышленной фильтрации на стадиях предфильтрации, осветления, обеспложивания и стерилизации питательных сред. Известен недостаток некоторых мембранных материалов — способность адсорбировать вещества [10], что является нежелательным в технологии приготовления питательных сред. Поэтому к фильтрам на данном этапе предъявляли следующие требования: способность удерживать балластные частицы, отсутствие адсорбции компонентов питательных сред, отсутствие абсорбции материала в среду, высокая химическая совместимость, высокая производительность, целостность, устойчивость к температурному воздействию и отсутствие негативного влияния на целевой продукт — биомассу.

В ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» промышленным способом производятся два лекарственных препарата для медицинского применения: иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий (АИГ) для постэкспозиционной профилактики бешенства и вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой (ХХВ). Кроме того, разработана экспериментально-производственная технология вакцины туляремийной живой (ЖТВ), лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения.

Изготовление лекарственных препаратов иммуноглобулиновой природы подразумевает этапы очистки и стерилизации труднофильтруемых белковых растворов с помощью баромембранных процессов, где особое внимание уделяется качеству и эффективности фильтрационных материалов [31]. В производстве АИГ в последние годы успешно применяются отечественные мембранные фильтры различных типов («Технофильтр»), проявившие себя как достойная альтернатива применявшимся ранее высококачественным фильтрам зарубежного производства брендов Sartorius, CUNO (3M Company). Для осветления, депирогенизации и стерилизации раствора АИГ разработана система каскадной фильтрации, состоящая из следующих технологических процедур: предварительная осветляющая фильтрация через патронные мембранные элементы ЭПМ.К-0,80/0,45 и модифицированные ЭПМ.К+-0,45/0,20 («Технофильтр»), диализ, двукрат-

ная фильтрация через мембранные сорбенты капсульного типа КФМ.К+ -0,20/0,20 «Технофильтр», совмещающая депирогенизацию и стерилизацию полуфабриката. Каскадная фильтрация позволяет получать очищенный препарат, соответствующий требованиям нормативной документации. Исследования по обоснованию внедрения мембранных технологий в производство АИГ на этапах очистки, депирогенизации и стерилизации полуфабриката отражены ранее в публикациях авторов статьи [2, 3].

В последнее десятилетие в рамках оптимизации приготовления рабического антигена на основе культурального вируса бешенства в РосНИПЧИ «Микроб» разработана экспериментальная технология культивирования производственного штамма фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» в культуре перевиваемых клеток Vero [1]. Поскольку вирус, культивированный *in vitro* реакторным или роллерным способами, уступает по активности и иммуногенности органо-тканевому вирусу, что обуславливает увеличение иммунизирующей дозы на этапе получения иммунной крови продуцентов, актуальны исследования по концентрированию культурального вируса. В рабиологии первые исследования по очистке и концентрированию *virus fixe* в производстве антирабических препаратов были проведены с вирусосодержащими суспензиями из ткани мозга зараженных животных, в литературе описаны методы осаждения вируса с использованием метанола [44] и ионообменных смол [38]. Р. Atanasiu et al. для очистки вируса использовали высокоскоростное центрифугирование при 140 тыс. г., что обеспечило повышение инфекционности вируса, но не позволило добиться высокой степени очистки вируса из-за высокого содержания балластных белков [38]. С внедрением в биотехнологическую практику культуральных технологий встал вопрос разработки способов очистки и концентрирования культурального вируса, среди которых очистка вируса бешенства ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия [43], комбинированное осаждение вируса бешенства ацетатом цинка с градиентным центрифугированием [42], концентрирование вируса с использованием геля фосфата алюминия и полиэтиленгликоля [28]. Т.В. Акинъшиной опубликованы результаты исследований по очистке и концентрированию вируса бешенства комбинацией различных способов: осаждением ПЭГ, абсорбцией-элюцией на геле фосфата алюминия, высокоскоростным и равновесным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы [4]. Для концентрирования культурального вируса бешенства предложено равновесное ультрацентрифугирование на подушке

сахарозы (55%), хлористого цезия (22%) и глицерина (80%) при 161 тыс. г в течение 4 ч, что позволяет получить высокоочищенный на 99,99% вирус [15]. Однако нельзя не отметить и принципиальные недостатки метода ультрацентрифугирования: дороговизна центрифужного оборудования, значительная энерго- и трудоемкость при использовании больших объемов культуральной жидкости, жесткие требования по обеспечению биологической безопасности. В связи с этим в последние десятилетия при совершенствовании биотехнологических схем производства противовирусных иммунобиологических препаратов одной из тенденций является переход от методов очистки вирусов путем ультрацентрифугирования к более рентабельным и технически простым процедурам, среди которых — концентрирование тангенциальной («кросс-флоу») ультрафильтрацией. Данный метод становится все более востребованным при производстве лекарственных препаратов благодаря экономичности и бережной обработке фильтруемого продукта [9]. Преимуществом фильтрации кросс-флоу является то, что при правильно подобранном размере пор мембранного модуля можно практически без потерь концентрировать целевой продукт с различной молекулярной массой. В литературе описан процесс концентрирования культурального *virus fixe* штамма Внуково-32 ультрафильтрацией при получении гетерологичной антирабической сыворотки, однако авторы не указывают величину номинальной отсечки по молекулярной массе используемых модулей [32]. S. Jagannathan et al. [39], R.Z. Mendonça et al. [40] указывают на возможность использования тангенциальной фильтрации для концентрирования фиксированного вируса бешенства в производстве антирабической вакцины на основе вируса бешенства, репродуцированного в культуре клеток Vero. В связи с вышеизложенным актуальным направлением служит разработка технологии концентрирования культурального вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Vero}» методом ультрафильтрации на этапе изготовления рабического антигена.

При производстве вакцины холерной бивалентной химической в конце XX века были выполнены исследования по ультрафильтрационному концентрированию О-антигена на половолоконных колонках [16]. Это дало возможность внедрить данный метод в производственный процесс выделения одного из иммуногенов вакцины — О-антигена, продуцируемого штаммом *V. cholerae* М-41 серовара Огава [18]. Вместе с тем внедренные технологические решения, наряду с положительными моментами (в первую очередь, существенная экономия сульфата аммония, затрачиваемого на осаждение), об-

ладали недостатками, присущими тупиковым процессам фильтрации: большие потери выделяемого продукта, небольшая удельная скорость процесса.

Выделение двух других иммуногенов вакцины — детоксицированного холерного токсина и О-антигена, продуцируемых штаммом *V. cholerae* 569В серовара Инаба, проводят последовательным двукратным осаждением сернокислым аммонием из всего объема детоксицированной культуральной среды, освобожденной от микробных клеток (от 200 до 400 дм³ за один технологический цикл). Это влечет за собой существенное расходование осадителя. Технологический процесс выделения холерогена-анатоксина является затратным и многоступенчатым. Необходимо подчеркнуть, что при данном способе выделения холероген-анатоксина отходом производства является от 180 до 360 дм³ 80%-ного раствора сернокислого аммония, удаляемого в очистную систему производства. Большим потенциалом для ликвидации указанных недостатков технологии обладает применение микро- и ультрафильтрации для разделения выделяемых веществ. Существующая технология также предусматривает удаление сульфата аммония из растворов протективных антигенов *V. cholerae* диализом против водопроводной воды в мешках из целлофана. Процесс протекает в неконтролируемых условиях, кроме того, существует возможность попадания в обессоливаемые антигены нежелательных примесей. Таким образом, необходимо было решить задачу по разработке технологии концентрирования, выделения и очистки антигенных компонентов ХХВ методом ультрафильтрации. Следует сказать и о том, что подробно исследования по обоснованию внедрения мембранных технологий в производство ХХВ отражены в публикациях авторов статьи [21–26].

Технология производства ЖТВ предусматривает получение посевных культур I, II и III генерации штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, процесс накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации, с последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата; при этом количество микробных клеток в 1 мл готовой лекарственной формы препарата должно быть 20±10 млрд [11, 12].

Отсутствие стадии концентрирования туляремийного микроба в технологии этой формы производства обладает рядом отрицательных моментов:

- потенциальность выбраковки биомассы после процесса ее накопления в случае недостаточной для приготовления готовой лекарственной формы концентрации микроорганизма;

- возможная повышенная реактогенность вакцины из-за наличия питательной среды после выращивания микроорганизмов.

Вышесказанное послужило побудительным мотивом для проведения экспериментальных исследований по концентрированию биомассы туляремийного микроба. Подробно данные исследования отражены в статье Бибикова Д.Н. с соавт. [8].

Цель настоящей работы — подвести итоги применения мембранных технологий в производствах иммунобиологических лекарственных препаратов, выпускаемых ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Материалы и методы

Водоподготовка и питательные среды.

Для получения воды очищенной использовали установку ЛИССКОН-101-5 (Россия), имеющую в комплекте обратноосмотическую мембрану RE 4040-BLR. Качество очищенной воды проверяли, используя методы и материалы в соответствии с ФС.2.2.0020.18 [13].

Приготовление питательных сред проводили в реакторах-ферментерах РЗРЯ–1000, РЗРЯ–630 (Россия). Осветление питательной среды на основе гидролизата казеина (лабораторного приготовления ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»; ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск; «Himedia», Индия) проводили активированным углем (ГОСТ 4453-74) до 3% с последующей предфильтрацией через картон фильтровальный КТФ-1П (ГОСТ 12290-89) на фильтродержателе ФПК-300 (Россия). Финишная фильтрация через фильтроэлемент патронного типа ЭПМ.К (Россия) на фильтродержателе ДС-1М-250 (Россия).

Питательную среду из гидролизата фибрина готовили в КПП-100 (Россия), фильтровали через последовательно соединенные фильтроэлементы патронного типа ЭПВг.П и ЭПМ.К (Россия) на фильтродержателе ДС-1М-250.

Фильтроэлементы ЭПМ.К проверяли на целостность с применением Palltronic Flowstar IV (Великобритания).

Определение качественных и количественных показателей питательных сред проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08 и МУ 3.3.2.2124-06 [27, 30]. Прозрачность питательных сред измеряли по оптической плотности фотоколориметрическим методом на фотоколориметре КФК-2 при длине волны $\lambda=540$ нм в кюветках высотой 10 мм, за стандарт брали 0,3%-ный раствор метанитрофенола.

Готовые питательные среды стерилизовали в био-реакторах BioForsPilot 300 при температуре 120 ± 2 °С и давлении $0,10 \pm 0,02$ МПа в течение 30 мин.

Эффективность питательных сред оценивали при глубинном культивировании штаммов-продуцентов ХХВ: *V. cholerae* O1 классического биовара: 569 В серовара Инаба и М-41 серовара Огава и штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, полученных из государственной коллекции РосНИПЧИ «Микроб».

Конечную концентрацию микробных клеток в бульонной культуре определяли по отраслевому стандарту мутности оптическому (ОСО) бактериальных взвесей 42-28-85П (10 МЕ), эквивалентной концентрации: для холерных вибрионов — $2,2 \times 10^9$ м.к.; для туляремийного штамма — 5×10^9 м.к.

Антирабический иммуноглобулин.

В работе использовали инактивированную суспензию культурального фиксированного вируса бешенства «Москва 3253_{Verо}». Процедуру инактивации фиксированного вируса бешенства выполняли согласно МУ 3.3.1.1099-02 [7] добавлением фенола в суспензию до конечной концентрации 0,5% с последующей инкубацией при температуре 37 °С в течение 24 ч.

Для очистки и концентрирования культурального *virus fixe* использовали установку «Vivaflow-200» (Sartorius, Германия) с мембранными модулями с НОММ 30, 100, 300, 500, 1000 кДа. Очистку ультрафильтрационной мембраны проводили циркуляцией раствора 1М гидроксида натрия через установку в течение 30 мин при температуре 50 °С и давлении 2,0 кгс/см². Дезинфекцию ультрафильтрационной установки осуществляли циркуляцией через установку 6,0%-ного раствора перекиси водорода в течение 15 мин при температуре 20 °С и давлении 2,0 кгс/см².

Концентрацию белка определяли методом с биуретовым реактивом [20].

Содержание фиксированного вируса бешенства в образцах до и после концентрирования определяли методом ПЦР в режиме реального времени по ранее разработанному способу [29].

Для оценки уровня содержания *virus fixe* в культуральной жидкости применяли «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)» по ТУ-9388-025-00492374-2007 (ФГБНУ «ФЦТРБ ВНИВИ», г. Казань). Постановку ИФА осуществляли по общепринятой методике [19] с инструментальным учетом результатов с помощью автоматических многоканальных фотометров S/N 11153 iMark™ или BioRad Model 680

при длине волны 490 нм, проводя расчет коэффициента специфичности (КС), равного отношению значения оптической плотности (ОП) продукта реакции в лунках с контрольным положительным антигеном или исследуемым материалом к ОП продукта реакции в лунках с контрольным отрицательным антигеном (ОПср(К-)). Реакцию считали положительной, если $КС \geq 2,1$ и отрицательной, если $КС < 2,1$.

Холерная химическая вакцина.

В ходе реализации исследований по обоснованию применения мембранных технологий в производстве ХХВ использовали детоксицированные безмикробные центрифугаты, полученные при производственном выращивании штаммов *V. cholerae* М-41 Огава и 569В Инаба.

Концентрирование, выделение и обессоливание протективных антигенов холерного вибриона осуществляли на ультрафильтрационных установках на базе фильтродержателя АСФ-009, снаряженного мембранными модулями с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 20, 50, 300 и 500 кДа, с площадью фильтрации, равной 0,1 м²; АСФ-020, снаряженной мембранами 30 кДа (площадь фильтрации каждой составляет 0,6 м²); Vivaflow-200 (Sartorius, Германия) с мембранными модулями с НОММ 30 и 100 кДа, с площадью фильтрации, равной 0,02 м².

Активность О-антигена устанавливали реакцией диффузионной преципитации (РДП) с O1 холерной сывороткой. Для измерения содержания О-антигена также использовали РНГА с диагностикомом эритроцитарным холерным антительным. Наибольшее разведение, при котором имелась положительная гемагглютинация, устанавливали за титр. Активность холерогена-анатоксина определяли путем РДП с антихолерогенной сывороткой.

Вакцина туляремийная живая.

При проведении экспериментов по обоснованию применения мембранных технологий в производстве ЖТВ использовали штамм *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». В качестве плотной питательной среды на этапах подготовки культуры и анализа ее свойств использовали FT агар (производство ГНЦ ПБМ, Оболенск).

Для оценки применимости методов концентрирования испытаниям подвергалась нативная культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенная методом глубинного культивирования в течение 22 ± 1 ч при температуре $37 \pm 0,5$ °С на жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата фибрина рН=7,2±1 [14]. В качестве критерия технологического применения методов

концентрирования было принято 10-кратное увеличение концентрации микроорганизмов. Седиментацию суспензии туляремийного микроба проводили при температуре 2...10 °С с периодическим отбором проб. Сгущение биомассы центрифугированием осуществляли на центрифуге Avanti J-301 (Beckman Coulter, США) при числе оборотов ротора, равным 12000 в течение 25 мин. Для оценки возможности применения фильтрационных методов использовали тангенциальную микрофильтрацию на микрофильтрационной установке Vivaflow 200 (Германия) через мембраны с размером пор 0,2 мкм.

Полученные концентраты анализировали по следующим показателям: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, степень диссоциации. Применяли методы, изложенные в ФС.3.3.1.0019.15 на вакцину туляремийную живую [12].

Концентрацию микробных клеток измеряли по отраслевому стандартному образцу мутности — ОСО мутности 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, эквивалентной концентрации 5 млрд. кл. мл⁻¹, с учетом разведения пробы. Для расчета общей концентрации (ОК) использовали формулу:

$$OK = \frac{(0,5+V) \times 5 \times 10^9}{0,5},$$

где: V — объем 0,9% раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл;

0,5 — объем испытуемого образца, мл;

5×10⁹ — эквивалент туляремийного микроба, соответствующий стандарту мутности (10 МЕ), м.к./мл.

Жизнеспособность (процент живых микробных клеток) определяли высевом на пластинки с ФТ агаром, учет проводили через 5 сут выдерживания посевов при температуре 37±1 °С. Из полученных проб (образцов) делали последовательные десятикратные разведения до 10⁻⁷, из которого по 0,1 мл взвеси отдельно для каждого образца высевали на 3 чашки Петри с питательной средой. За количество живых микробных клеток принимали среднее арифметическое определений количества выросших колоний в трех образцах. Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ живых м.к.} = \frac{БК}{ОК} \times 100\%,$$

где: БК — количество живых м.к. в 1 мл;

ОК — общая концентрация м.к.

Степень диссоциации культуры определяли по числу SR (белых) колоний от общего количества выросших

колоний. После инкубации чашек Петри в термостате при температуре 37±1 °С в течение 5 сут их помещали на 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 °С. После этого подсчитывали число иммуногенных «белых» и неиммуногенных «серых» колоний и вычисляли их процентное соотношение.

Остальные методические приемы описаны в результатах исследований.

Результаты и обсуждение

Мембранные материалы в технологии приготовления воды очищенной.

В настоящей работе приведен опыт применения мембранных технологий при очистке воды на этапе приготовления питательных сред для глубинного культивирования микроорганизмов. Потребность в очищенной воде в нашем случае составляет не менее 150 л/ч. Нами выбрана технологическая схема получения очищенной воды на установке ЛИССКОН-101-5, способная заменить дистилляцию на паровом дистилляторе ПД-200 [6, 35].

Первая ступень водоподготовки осуществляется на автоматическом фильтре осветления 1054/ V1" EI FAG. Фильтр засыпан кварцевым песком, с его помощью из воды удаляются примеси размером 20–25 мкм. Вторая ступень водоподготовки осуществляется на автоматическом угольном фильтре 1054/V1" EI Carbsorb 30. Фильтр засыпан активированным углем, с его помощью происходит дехлорирование, удаление привкуса, запаха и растворенных примесей, что способствует защите обратноосмотических мембранных элементов и ионообменных смол. Регенерация первой и второй ступени проводится в автоматическом режиме обратным током в зависимости от прошедшего через них объема воды или в заранее заданное время. Третья ступень водоподготовки осуществляется через механический фильтр SL20/Pentek P 5-20. Фильтр изготовлен из 100% полипропилена, с его помощью удаляются примеси размером 5–20 мкм. Четвертая ступень водоподготовки осуществляется через обратноосмотическую мембрану RE 4040-BLR. Материал мембраны выполнен из тонкопленочного полиамида, покрытого стекловолокном. С помощью мембраны происходит удаление солей натрия, калия, кальция, магния, железа, марганца, тяжелых металлов, а также хлоридов, нитратов, нитритов, сульфатов, сульфидов, гербицидов, пестицидов и бактерий. Регенерация проводится кислотнo-щелочной промывкой в ручном режиме при ухудшении качества получаемой воды или

образовании перепада давления более 0,15 МПа. Пятая ступень водоподготовки осуществляется на фильтре смешанного действия 0844/N1"990S MB-50. Фильтр засыпан ионообменной смолой смешанного действия, с его помощью происходит очистка воды от всех катионов и анионов. Регенерация фильтра не предусмотрена.

Данная схема имеет производительность 200–250 л/ч и позволяет получить очищенную воду, соответствующую требованиям ФС.2.2.0020.18 [13].

Опыт эксплуатации установки в течение восьми лет подтвердил необходимость:

- непрерывной эксплуатации оборудования, перерыв в работе не более 20 часов;
- своевременной регенерации обратноосмотической мембраны при увеличении перепада давления на входе и выходе более 0,1 МПа;
- своевременной замены фильтров и засыпок фильтрационных колонн согласно рекомендации производителя (песчаный и угольный фильтры — 1 раз в 3 года, механический фильтр — 1 раз в 3 месяца, обратноосмотическая мембрана — 1 раз в 3 года, фильтр с ионообменной смолой смешанного действия — 1 раз 2 года);
- регулярной санации установки, трубопровода и емкостей для хранения воды очищенной, в нашем случае паром под давлением 0,05 МПа (не менее 1 раза за 6 месяцев).

Мембранные материалы в технологии приготовления питательных сред.

Технологическим этапом приготовления питательных сред, используемых в производстве вакцин для профилактики особо опасных инфекций (холера, туляремия), является процедура очистки и осветления от различных видов загрязнения (нерастворимые частицы пептона, негидролизированные комплекс-протеиды белка, меланин подобный пигмент и др.).

В технологии приготовления питательной среды для культивирования холерного вибриона на этапе осветления бульона на основе гидролизата казеина с добавлением до 1% пептона ферментативного использовали двухэтапную фильтрацию [36]. На этапе предварительной фильтрации — картон КТФ-1П, обладающий высокой грязеемкостью, который обеспечивает максимальное (до 96%) задержание пигментных комплексов и частиц активного угля. На этапе финишной очистки — патронный мембранный фильтр ЭПМ.К-100/045-Д-250М с двуслойной мембраной и микронным рейтингом соответственно 1,0 и 0,45 мкм. Материалы выбраны с учетом грязевой нагрузки, необходимости осветления

питательной среды, имеющей $pH=8,0\pm 0,1$, с учетом её температуры и объема (400 л).

Внедренный метод фильтрации позволил сократить продолжительность технологической операции, обеспечить высокую степень очистки и снизить потери питательной среды на 29% по сравнению с двукратной фильтрацией через КТФ-1П.

В экспериментально-производственной технологии ЖТВ для глубинного культивирования использовали разработанную ранее жидкую питательную среду на основе сухого ферментативного гидролизата фибрина, имеющую в составе глюкозу и пантотенат кальция [14].

Для очистки среды (80 л) от крупных негидролизированных комплекс-протеидов крови лошади (гемоглобин, гликопротеиды, липопротеиды, иммуноглобулины и т.д.) применяли каскадную фильтрацию через последовательно соединенные: патронный глубинный фильтр ЭПВг.П-050-Д-250 с размером пор 0,5 мкм и патронный мембранный фильтр ЭПМ.К-080/045-Д-250М с двуслойной мембраной и микронным рейтингом соответственно 0,8 и 0,45 мкм [5, 37].

Мембранные фильтрующие элементы с размером пор от 0,1 до 3 мкм представляют собой гофрированные фильтры с большой площадью поверхности (до 1 м² на элемент 10»), которые обеспечивают абсолютное удержание частиц в области указанного размера пор. В отличие от глубинных фильтров удержание частиц происходит преимущественно на поверхности мембраны.

Проверка удерживающей способности и адсорбционных свойств проводилась с учетом реальных условий производства питательных сред (объем, pH) и условий фильтрации (температура 65 ± 5 °С, рабочее давление 0,1 МПа). Стабильность результатов испытуемых продуктов свидетельствовала об адекватном режиме фильтрации и отсутствии негативного влияния фильтроматериалов на питательные среды, используемые в производстве вакцин (табл. 1, 2).

Адекватность выбранных материалов для фильтрации в технологии приготовления питательных сред, используемых при производстве вакцинных препаратов, подтверждена в том числе при анализе биологических показателей глубинного культивирования в жидкой среде из панкреатического гидролизата казеина с пептоном (1%) штаммов-продуцентов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 (см. табл. 1) и при глубинном культивировании в жидкой среде из панкреатического гидролизата фибрина вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (см. табл. 2) [33].

Показатели качества питательной среды для глубинного культивирования холерных штаммов до и после фильтрации

Показатель	До финишной фильтрации	После фильтрации через фильтр ЭПМ.К
рН среды	8,0±0,05	7,97±0,02
Прозрачность среды (оптическая плотность)	0,30±0,01	0,118±0,013
Аминный N, %	0,225±0,005	0,219±0,006
Na ₂ HPO ₄ , %	0,06	0,06
NaCl, %	0,5	0,497±0,003
Пептон, %	1,080±0,005	0,960±0,017
Эффективность среды, млрд м.к./мл (<i>V. cholerae</i> O1 классического биовара 569 В серовара Инаба)	-	72,0±2,0
Эффективность среды, млрд м.к./мл (<i>V. cholerae</i> O1 классического биовара М-41 серовара Огава)	-	68,4±0,1

Таблица 2

Показатели качества питательной среды для глубинного культивирования туляреимного штамма до и после фильтрации

Показатель	До фильтрации	После фильтрации (фильтры ЭПВг.П и ЭПМ.К)
рН среды	7,2±0,02	7,20±0,04
Прозрачность среды (оптическая плотность)	0,38±0,01	0,250±0,008
Аминный N, %	0,32±0,003	0,320±0,004
Общий N, %	0,60±0,01	0,592±0,009
Глюкоза, %	1	1
NaCl, %	0,5	0,500±0,004
C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀ , %	0,005	0,005
Эффективность среды, млрд м.к./мл (<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ)	-	35±0,5

Производитель (НПО «Технофильтр») рекомендует после регенерации многократно использовать фильтроэлементы до увеличения перепада давления до 0,3 МПа. Увеличение перепада давления зависит от большого количества факторов: свойств фильтруемой среды, ее загрязненность, вязкость, условия фильтрации (максимально возможный перепад давления, температура) и т.д. В технической характеристике фильтроэлементов все показатели приведены по воде очищенной. Питательные среды, используемые в производстве вакцин, содержат в своем составе в основном гидролизат казеинового и фибринового белка и пептон. При производстве питательных сред в наших условиях максимальное давление фильтрации составляет 0,1 МПа. По результатам выполненной экспериментально-производственной работы сделан вывод об эффективности использования регенерированных фильтроэлементов до 7 раз без изменения качества питательных сред [34].

Мембранные материалы в технологии приготовления антирабического иммуноглобулина.

В ходе исследований по очистке и концентрированию культурального вируса для повышения иммуно-

генности культурального *virus fixe* использовали установку тангенциальной ультрафильтрации Vivaflow 200, снаряженную полипропиленовыми мембранами. Были поставлены задачи по выбору оптимальных значений НОММ для используемых мембран и гидродинамического режима фильтрации.

Для решения первой задачи ультрафильтрацию в режиме кросс-флоу проводили с использованием мембран с НОММ 10, 30, 100, 300 и 1000 кДа при значении давления 0,21 МПа. Технологический процесс концентрирования включал в себя ряд последовательно выполняющихся операций: промывка мембраны от дезинфицирующего средства, проведение ультрафильтрации, промывка мембраны от остатков концентрируемого продукта, очистка мембраны от остатков концентрируемого продукта, дезинфекция мембраны. На рисунке 1 представлена установка для фильтрации кросс-флоу и направления потоков подачи исходного продукта и выхода фильтрата.

Критерием окончания процесса концентрирования являлось уменьшение как минимум в 50 раз объема обрабатываемого продукта. По окончании процесса исследовали удельную скорость фильтрации и свойства

концентрируемого продукта: концентрацию вируса бешенства в фильтрате и концентрате, содержание белка.

По значениям данных показателей была определена эффективность баромембранного процесса (табл. 3).

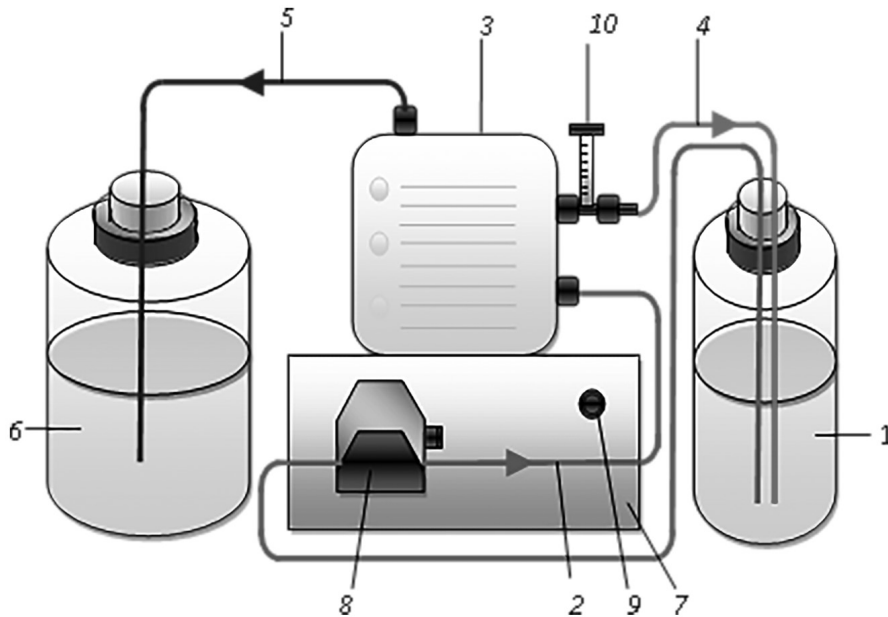


Рис. 1. Установка для концентрирования вирусного материала кросс-флоу. 1 – концентрируемый целевой продукт; 2 – линия подачи исходного продукта на модуль; 3 – фильтрационный модуль; 4 – линия возврата концентрируемой суспензии; 5 – линия выхода фильтрата; 6 – сосуд для сбора отработанного фильтрата; 7 – насос перистальтический; 8 – головка насоса перистальтического; 9 – устройство для регулировки давления; 10 – датчик давления

Таблица 3

Эффективность концентрирования инактивированной культуральной суспензии *virus fixe* «Москва 3253_{Vero}» на установке тангенциальной ультрафильтрации Vivaflow 200 в зависимости от величины номинальной отсечки по молекулярной массе используемых мембран

НОММ мембран Содержание <i>virus fixe</i> (ИФА, обратный титр)	Наименование показателя				
	Содержание белка, %	Концентрация <i>virus fixe</i> по результатам ПЦР-РВ, ГЭ/мл	Средняя удельная скорость фильтрации, дм ³ /м ² /ч		
10 кДа	Ц	256	0,72±0,03	9,69×10 ⁶	38,2±0,1
	Ф	не обнаружено	0,36±0,01	не обнаружено	
	К	512	9,38±0,08	6,84 ×10 ⁷	
30 кДа	Ц	256	0,72±0,03	9,69×10 ⁶	45,0±0,4
	Ф	не обнаружено	0,36±0,00	не обнаружено	
	К	512	9,32±0,05	6,72×10 ⁷	
100 кДа	Ц	256	0,72±0,03	9,69×10 ⁶	58,3±0,3
	Ф	не обнаружено	0,36±0,01	не обнаружено	
	К	512	9,57±0,06	5,79×10 ⁷	
300 кДа	Ц	256	0,72±0,03	9,69×10 ⁶	72,4±0,1
	Ф	не обнаружено	0,43±0,02	не обнаружено	
	К	512	9,1±0,07	7,14 ×10 ⁷	
1000 кДа	Ц	256	0,72±0,03	9,69×10 ⁶	94,5±0,4
	Ф	128	0,43±0,02	9,60 ×10 ⁶	
	К	не обнаружено	2,1±0,05	не обнаружено	

Примечание: Ц – инактивированная исходная суспензия культурального *virus fixe*; К – концентрат; Ф – фильтрат

Результаты опыта показали, что использование мембран с НОММ 10, 30, 100, 300 кДа позволяет концентрировать исходный продукт, о чем свидетельствуют значения вышеназванных показателей; однако оптимальным является применение мембраны с НОММ 300 кДа. В этом случае методом ПЦР-РВ регистрировали концентрацию вируса $7,14 \times 10^7$ ГЭ/мл (до концентрирования — $9,69 \times 10^6$ ГЭ/мл), а средняя удельная скорость фильтрации была наибольшей — $72,4 \text{ дм}^3/\text{м}^2/\text{ч}$. Использование мембраны с величиной НОММ 1000 кДа неэффективно, концентрирование в этом случае не происходит и, как свидетельствовали результаты ИФА и ПЦР, вирус бешенства в целевом продукте отсутствовал.

Эффективность процесса фильтрации во многом определяется значением трансмембранного давления. В эксперименте с использованием мембраны с НОММ 300 кДа была установлена оптимальная величина давления при концентрировании культуральной жидкости кросс-флоу, которая составила $0,25 \pm 0,01$ МПа. При этом условии баромембранный процесс протекает достаточно эффективно — средняя удельная скорость фильтрации составила $78,2 \pm 0,2 \text{ дм}^3/\text{м}^2/\text{ч}$.

Таким образом, для концентрирования культуральной инактивированной суспензии *virus fixe* штамма «Москва 3253_{Vero}» целесообразно использовать метод ультрафильтрации кросс-флоу с применением мембран с номинальной отсечкой, не превышающей 300 кДа, при давлении $0,25 \pm 0,01$ МПа. Концентрирование вирусной суспензии позволило увеличить концентрацию вируса бешенства до уровня, сопоставимого с органо-тканевым антигеном. По результатам ИФА, содержание вируса бешенства в органо-тканевом антигене соответствовало разведению 1:512; в вирусной суспензии после роллерного культивирования — 1:256; в вирусной суспензии после концентрирования кросс-флоу — 1:512–1:1000. Полученные данные позволяют сделать вывод об эффективности способа тангенциальной фильтрации для концентрирования культуральной вирусной суспензии при изготовлении культурального рабического антигена.

Мембранные материалы в технологии приготовления холерной химической вакцины.

Первым этапом исследований стало повышение качества ультрафильтрационного концентрирования О-антигенов *V. cholerae*, в силу того, что применяемый метод ультрафильтрации в «тупиковом» режиме характеризовался большими потерями выделяемого продукта и маленькой удельной скоростью процесса. Первоначальные эксперименты проводили на плоскорамных ультрафильтрационных элементах с НОММ 20 кДа

(эффективная поверхность фильтрации — $0,1 \text{ м}^2$), установленных в аппарат марки АСФ-009. Первым шагом исследований являлось определение возможности применения способа проточной ультрафильтрации для концентрирования О-антигена штамма холерного вибриона М41 серовара Огава. Выявлено, что количество этого иммуногена в пермеате увеличивалось в 8 раз при десятикратной степени концентрирования, при его отсутствии в ретентате и сорбции на ультрафильтрационном элементе. Полученные лиофилизаты препарата по своим характеристикам соответствовали установленным регламентом производства, при этом количество О-антигена в сопоставлении с традиционной технологией было существенно (до 1,5 раз) больше. Также при проведении этих экспериментов выявлена нецелесообразность пятнадцати- и двадцатикратного уменьшения количества исходного продукта при концентрировании в силу возникающих из-за сорбции на ультрафильтрационном элементе потерь и, соответственно, меньшей экономичности производства.

Затем проводили исследования по возможности применения ультрафильтрационных элементов с порогом отсечки более 20 кДа для концентрирования О-антигена. Апробированы ультрафильтрационные элементы с порогами отсечки по молекулярной массе — 30, 50, 100, 300 и 500 кДа. Реализованные эксперименты дали основания говорить об их применимости, в силу того, что содержание иммуногена в ретентате возрастает восьмикратно, при его отсутствии в пермеате. Наибольший удельный расход отведения пермеата определен, как и предполагалось, при использовании элементов с НОММ 500 кДа (табл. 4). Также показано, что активность лиофилизатов О-антигенов, полученных при применении различных видов ультрафильтрационных элементов, соответствует установленным регламентом производства параметрам при отсутствии существенных различий величин этого показателя.

Далее оценивали возможность интенсификации фильтрации в тангенциальном потоке жидкости на плоскорамных элементах за счет подбора барометрических и температурных параметров. Выявлено, что максимальная производительность ультрафильтрационного процесса наблюдается при давлении, создаваемом фильтрационной машиной на входе и выходе фильтруемого продукта — 2,5 бар и 0,5 бар, соответственно (табл. 5), и температуре продукта — 37°C (табл. 6). Контроль свойств лиофилизатов О-антигенов, произведенных при применении температур 8, 20 и 37°C , выявил, что их активность соответствовала установленным регламентом производства показателям (табл. 7). Необходимо отметить, что величины активности О-антигенов не имеют существенных различий.

Таблица 4

**Результаты применения различных видов ультрафильтрационных элементов
для концентрирования О-антигена**

Характеристика	Отсечка по молекулярной массе ультрафильтрационных элементов, кДа														
	30			50			100			300			500		
	СКЖ	П	Р	СКЖ	П	Р	СКЖ	П	Р	СКЖ	П	Р	СКЖ	П	Р
Активность О-антигена в РДП с О1 сывороткой, обратный титр	8	0	64	8	0	64	8	0	64	8	0	64	8	0	64
Удельный расход отведения пермеата, дм ³ /м ² /ч	14,9			16,3			20,6			24,9			36,2		
Эффективная поверхность фильтрации, м ²	0,02			0,1			0,02			0,1			0,1		

Примечание: СКЖ – сепарированная культуральная жидкость, Р – ретенат, П – пермеат

Таблица 5

Удельный расход пермеата при различном значении давления, создаваемом фильтрационной машиной

Давление, создаваемое фильтрационной машиной, бар		Отсечка по молекулярной массе ультрафильтрационных элементов, кДа					
на входе фильтруемого продукта	на линии выхода пермеата	20	30	50	100	300	500
		Удельный расход пермеата, дм ³ /м ² /ч					
1,5	0	9,6	11,2	12,2	15,5	18,6	27,1
2,0	0	10,3	11,8	13,0	16,5	19,8	29,0
2,5	0	11,5	13,4	14,7	18,5	22,4	32,5
3,0	0	11,0	12,2	13,4	16,9	20,4	29,7
1,5	0,5	12,9	14,9	16,3	20,6	24,9	36,2
2,0	0,5	14,1	16,4	18,0	22,7	27,3	39,9
2,5	0,5	18,0	21,2	23,1	29,3	35,0	51,4
3,0	0,5	14,5	16,8	18,4	23,3	28,1	40,2
1,5	1,0	10,7	11,8	13,6	17,2	20,7	30,2
2,0	1,0	11,7	13,5	14,9	18,7	22,6	32,9
2,5	1,0	14,3	16,6	18,2	22,9	25,1	40,2
3,0	1,0	12,2	14,2	15,5	19,6	23,7	34,5

Таблица 6

**Влияние температуры на производительность ультрафильтрационного процесса
и свойства О-антигена *V. cholerae* М-41 серовара Огава**

Характеристика	Отсечка по молекулярной массе ультрафильтрационных элементов, кДа					
	20	30	50	100	300	500
Активность О-антигена в РДП с О1 сывороткой, обратный титр	64 64					
Удельный расход пермеата, дм ³ /м ² /ч	$\frac{28,1}{40,2}$	$\frac{32,8}{46,9}$	$\frac{35,8}{51,0}$	$\frac{45,2}{64,56}$	$\frac{54,7}{78,2}$	$\frac{79}{114}$

Примечание: в числителе – данные при температуре продукта 20 °С, в знаменателе – 37 °С.

Таблица 7

Характеристики лиофилизатов

Характеристика	Отсечка по молекулярной массе ультрафильтрационных элементов, кДа						Д
	20	30	50	100	300	500	
Активность О-антигена в РНГА с О1 сывороткой, обратный титр	$\frac{224}{256}$	$\frac{256}{212}$	$\frac{212}{224}$	$\frac{224}{256}$	$\frac{256}{212}$	$\frac{256}{256}$	≥100

Примечание: Д – величина характеристики по нормативным документам; в числителе – данные при температуре продукта 20 °С, в знаменателе – 37 °С.

Итогом проведения исследований по повышению качества ультрафильтрационного концентрирования О-антигенов *V. cholerae* стало создание на производственных площадях приготовления ХХВ участка концентрирования иммуногенов (рис. 2). Выполнение более 50 промышленных технологических циклов концентрирования подтвердило данные проведенных исследований.

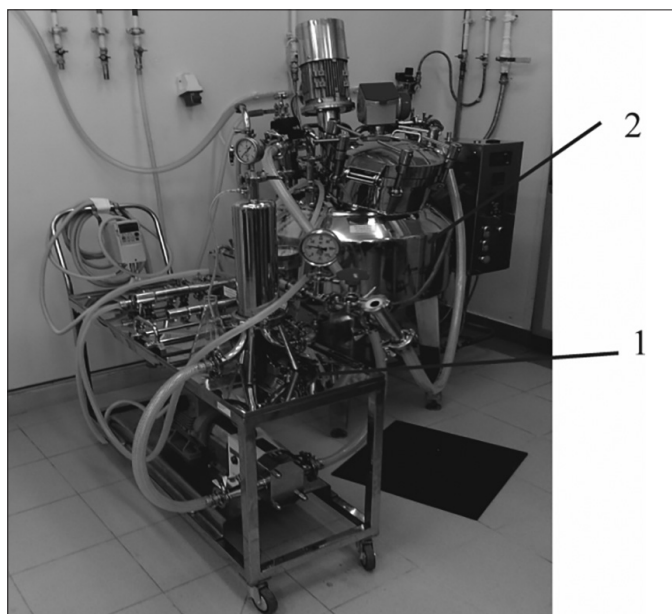


Рис. 2. Участок концентрирования иммуногенов ХХВ: 1 – фильтрационная установка АСФ-020; 2 – емкость РВД-100

Вторым этапом экспериментального обоснования ультрафильтрационных технологий в производстве ХХВ было исследование возможности использования тангенциальной ультрафильтрации для концентрирования иммуногенных компонентов вакцины, продуцируемых штаммом *V. cholerae* 569В серовара Инаба.

Выделение О-антигена Инаба и холерогена-анатоксина, по действующей на момент начала наших исследований технологии, проводили последовательным двукратным осаждением сернокислым аммонием из всего объема детоксицированной культуральной среды, освобожденной от микробных клеток штамма *V. cholerae* 569В серовара Инаба (от 200 до 500 дм³ за один технологический цикл). Это влекло за собой существенное расходование осадителя. Положительный опыт применения фильтрации в тангенциальном потоке жидкости на плоскорамных элементах для концентрирования О-антигена *V. cholerae* М-41 серовара Огава побудил нас к проведению исследований по

возможности использования разработанных технологических приемов для концентрирования О-антигена Инаба и холерогена-анатоксина. Необходимо отметить, что данные изыскания осуществлялись практически одновременно с совершенствованием технологии ультрафильтрационного концентрирования О-антигена *V. cholerae* М-41 серовара Огава. Без сомнения, что методика проведения исследований и их последовательность остались практически неизменными. Также изначально была предпринята попытка концентрирования иммуногенов ХХВ проточной ультрафильтрацией, применяя в работе плоскорамные ультрафильтрационные элементы с НОММ 20 кДа (эффективная поверхность фильтрации – 0,1 м²), установленные в аппарат марки АСФ-009. Характеристики препаратов, полученных в ходе экспериментов, позволяют констатировать шестнадцатикратное возрастание количества О-антигена и холерогена-анатоксина в пермеате, а также отсутствие их сорбции на ультрафильтрационном элементе и неприсутствие в ретентате.

Характеристики полученных лиофилизатов препарата соответствовали установленным регламентом производства, при этом удельное количество целевого продукта (согласно пропорции – вес лиофилизата к объему вещества, освобожденного от ионов сернокислого аммония) больше, чем у лиофилизата, произведенного с применением традиционной технологии, при повышении по абсолютной величине в 1,2 раза. Следует сказать о том, что в поставленных опытах количество сернокислого аммония, израсходованного для выделения антигенов, в сопоставлении с существующим способом, было в 10 раз меньше. Аналогично при проведении этих экспериментов выявлена нецелесообразность пятнадцати- и двадцатикратного уменьшения количества исходного продукта при концентрировании.

Далее исследовали возможность применения ультрафильтрационных элементов с порогами отсечки по молекулярной массе, равными 30, 50 и 100 кДа. Выявлена возможность использования ультрафильтрационных элементов с НОММ 30 и 50 кДа для концентрирования антигенов, в силу того, что содержание иммуногенов в ретентате возрастает в 16 раз, при их отсутствии в пермеате. Наибольший удельный расход отведения пермеата определен при использовании элементов с НОММ 50 кДа. Что касается элементов с НОММ 100 кДа, то их применение нежелательно в силу того, что значительное количество холерогена-анатоксина проходит в пермеат (табл. 8).

Результаты применения ультрафильтрационных элементов для концентрирования антигенов

Характеристика	Отсечка по молекулярной массе ультрафильтрационных элементов, кДа											
	20			30			50			100		
	СКЖ	П	Р	СКЖ	П	Р	СКЖ	П	Р	СКЖ	П	Р
Активность О-антигена в РДП с О1 сывороткой, обратный титр	4	0	64	4	0	64	4	0	64	4	0	64
Активность холерогена-анатоксина в РДП с антихолерогенной сывороткой, обратный титр	2	0	32	2	0	32	2	0	32	2	1	4
Удельный расход отведения пермеата, $\text{дм}^3/\text{м}^2/\text{ч}$	21			34			39			62		
Эффективная поверхность фильтрации, м^2	0,1			0,02			0,1			0,02		

Примечание: СКЖ – сепарированная культуральная жидкость, П – пермеат, Р – ретентат

При обосновании оптимальных барометрических и тепловых параметров процесса показана аналогичность результатов, полученных в опытах по концентрированию О-антигена Огава. Максимальная производительность ультрафильтрационного процесса наблюдается при давлениях, создаваемых фильтрационной машиной на входе и выходе фильтруемого продукта – 2,5 бар и 0,5 бар, соответственно, и температуре продукта – 37 °С. Контроль свойств лиофилизатов, произведенных при применении температур 8, 20 и 37 °С, выявил отсутствие влияния температур.

Впоследствии апробировали разработанную технологию концентрирования антигенов способом проточной ультрафильтрации на плоскораменных элементах при масштабном процессе приготовления вакцины. Процесс осуществляли на оборудовании созданного участка концентрирования иммуногенов ХХВ, используя ультрафильтрационные модули с НОММ 30 кДа, экспериментально обоснованные барометрические и тепловые параметры процесса и кратность уменьшения объема концентрируемого вещества. Выполнение более 100 технологических циклов подтвердило данные проведенных исследований.

Третьим этапом экспериментального обоснования ультрафильтрационных технологий в производстве ХХВ была разработка аппаратного метода обессоливания антигенных компонентов ХХВ. Эти исследования были вызваны длительностью производственных процедур обессоливания.

После проведения цикла пилотных исследований нами обосновано применение процедуры диафильтрации, проводимой в циклических условиях с использованием ранее обоснованных барометрических параметров: давления, создаваемые фильтрационной машиной на входе и выходе фильтруемого продукта – 2,5 бар и 0,5 бар, соответственно. Удаление ионов аммония и сульфат-ионов

из растворов О-антигенов Огава и Инаба осуществляли с использованием плоскораменных ультрафильтрационных элементов с НОММ 30 кДа на оборудовании участка концентрирования иммуногенов ХХВ. Полученные нами результаты позволяют констатировать продолжительность процесса деминерализации в пределах от 2 до 4 ч (рис. 3).

Максимальный объем воды, израсходованной при деминерализации, был 300 дм^3 . Наибольшее время осуществления процедуры, а также количество воды выявлены при деминерализации холерогена-анатоксина. Данный факт логично вытекает из большего, в сопоставлении с О-антигенами Инаба и Огава, количеством осадителя. Применение ионселективного электрода, установленного в линию возврата деминерализуемого вещества в исходную емкость, дало возможность измерять содержание ионов аммония в режиме «on-line», что позволяет проводить процесс в контролируемых условиях. Данная технология внедрена в производственный процесс получения ХХВ.

Заключительным, четвертым этапом экспериментального обоснования ультрафильтрационных технологий в производстве ХХВ было внедрение ультрафильтрационного фракционирования холерогена-анатоксина.

Применение плоскораменных ультрафильтрационных элементов с НОММ 100 кДа для концентрирования холерогена анатоксина показало, что большая его часть уходит в пермеат, однако до 25% остается в ретентате. Поэтому существует необходимость использования ультрафильтрационных элементов с большей отсечкой по молекулярной массе. Нами, основываясь на результатах исследований по концентрированию О-антигена Огава, с целью максимального удаления из сепарированной культуральной жидкости О-антигена Инаба применен ультрафильтрационный элемент с НОММ 300 кДа. В

ходе данного этапа работы также выявляли возможность повышения производительности процесса фильтрации по обоснованным ранее для концентрирования антигенов ба-

рометрическим и температурным параметрам. Полученные данные позволили говорить о том, что использование примененных технологических решений дает такой же эффект.

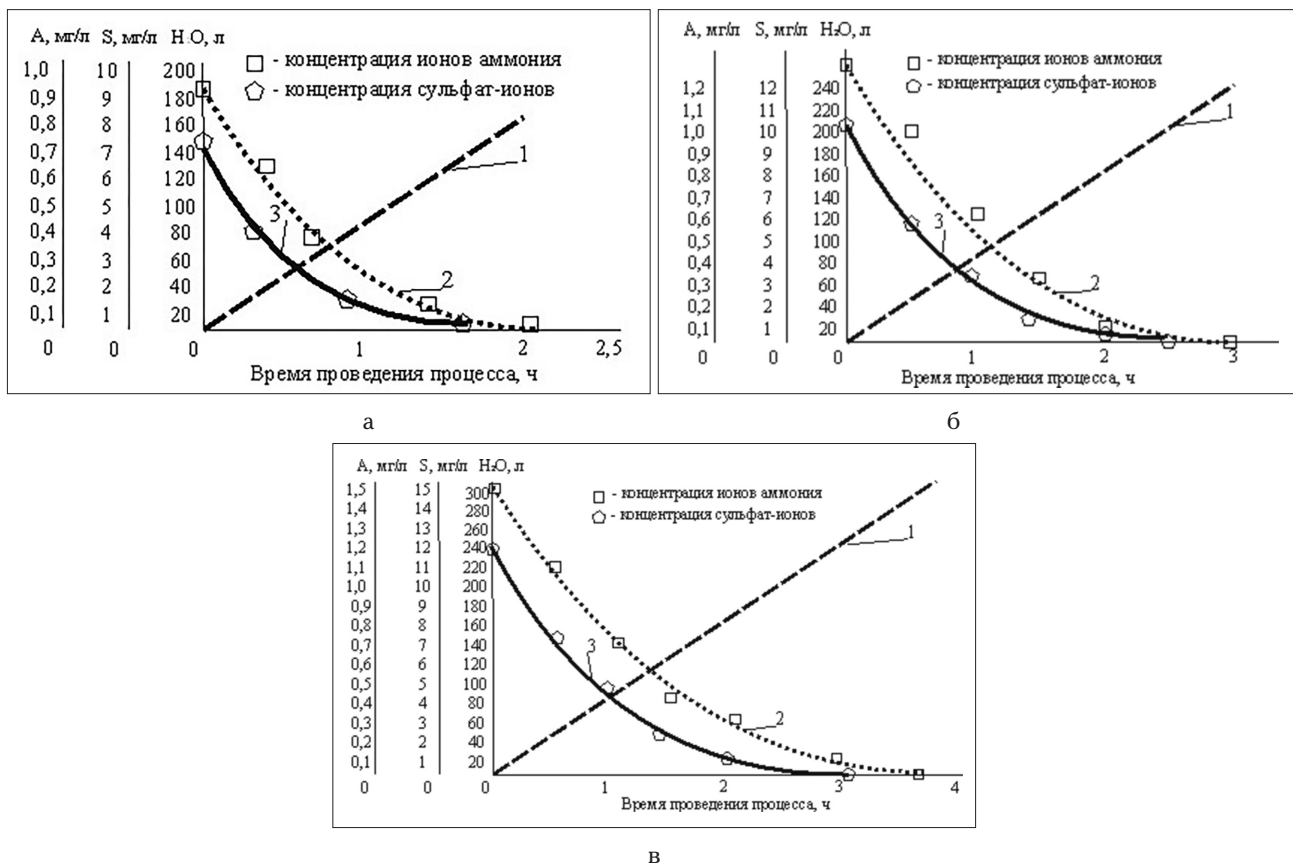


Рис. 3. Динамика процесса обессоливания (а — О-антигена штамма *V. cholerae* 569В Инаба; б — О-антигена штамма *V. cholerae* M-41 Огава; в — холерогена-анатоксина штамма *V. cholerae* 569В Инаба): А и S — концентрация ионов аммония и сульфат-ионов, соответственно; 1 — количество воды, израсходованной для обессоливания; 2 — кривая изменения концентрации ионов аммония; 3 — кривая изменения концентрации сульфат-ионов

Дальнейшим шагом работы была отработка технологических приемов концентрирования и очистки холерогена-анатоксина, содержащегося в пермеате сепарированной культуральной жидкости, полученном ультрафильтрацией на фильтрационных элементах с НОММ 300 кДа. Использовали фильтрационные элементы с НОММ 30 кДа. Определяли достижимость повышения производительности фильтрации по обоснованным ранее для концентрирования антигенов барометрическим и температурным параметрам

процесса. Можно говорить о том, что использование примененных технологических решений дает такой же эффект. При оценке возможности удаления балластных примесей из концентрата холерогена-анатоксина применили проточную диа-ультрафильтрацию на плоскорамных фильтрующих элементах с НОММ 30 кДа. Максимальный эффект обнаружился при диафильтрации водой для инъекций ФС.2.2.0019.18 в количестве, в три раза превышающем объем исходного продукта (табл. 9).

Таблица 9

Результаты исследований по диафильтрации ультрафильтрацией холерогена-анатоксина *V. cholerae* 569В Инаба (n=3)

Количество стерильной деионизированной воды, дм ³	Концентрация белка, мг/см ³	Содержание холерогена-анатоксина в РДП с АХС, обратный титр
0	6,51±0,12	32
1,0	5,92±0,15	32
2,0	5,33±0,21	32
3,0	4,91±0,12	32
4,0	4,89±0,11	32
5,0	4,92±0,14	32

Вакцина туляремийная живая

Принято выделять следующие методы концентрирования, нашедшие наиболее широкое применение для сгущения бактериальной массы, выращенных глубинным способом: седиментация, центрифугирование (сепарирование) и фильтрование, обладающие присущими им недостатками и достоинствами.

Результаты исследований по экспериментальному обоснованию технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ представлены в таблице 10.

Исходные показатели полученной биомассы (микробной суспензии) были следующие: концентрация микробных клеток — $26,8 \times 10^9$ м.к./мл, жизнеспособность $98 \pm 1\%$, степень диссоциации $81 \pm 2\%$.

Таблица 10

Результаты исследований по экспериментальному обоснованию технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Метод концентрирования	После концентрирования		
	концентрация микробных клеток, м.к. в 1 мл.	процент живых микробных клеток, %	степень диссоциации (кол-во SR (белых) колоний), %
Центрифугирование	$270,9 \pm 0,9 \times 10^9$	$58,9 \pm 2,2$	$87,2 \pm 2,2$
Тангенциальная фильтрация	$315,9 \pm 0,9 \times 10^9$	$98,2 \pm 0,2$	$81,3 \pm 0,5$
Седиментация (до 1/2 объема)	$27,2 \pm 0,5 \times 10^9$	$85,5 \pm 0,5$	50 ± 1

Исходя из данных, представленных в таблице 10, можно сделать вывод о том, что использование микрофильтрации позволяет достигнуть 10-кратное увеличение концентрации микробов в суспензии; при этом время протекания технологического процесса при объеме исходного материала, равном $1,0 \text{ дм}^3$, составило не более 1 ч. Это является более предпочтительным по сравнению с результатами седиментации, при которой 10-кратная степень концентрирования не была достигнута и через 39 сут (время наблюдения). Следовательно, время приготовления микробного концентрата сократилось более чем в 900 раз (в часах, или 38 раз — в сутках). В полуфабрикате вакцинного препарата, произведенным методом мембранного разделения (микрофильтрации), не происходило ухудшения характеристик в сравнении с нативной культурой *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученной после ее глубинного культивирования.

Что касается использования центробежного метода для концентрирования туляремийного микроба, то можно констатировать следующее. Необходимая степень концентрирования достигалась за то же время, что и при тангенциальной фильтрации. Но жизнеспособность микробной суспензии сильно снижалась — на 40%, хотя этот показатель оставался в пределах регламентируемого (количество живых клеток должно составлять не менее 40% от общего количества микробных клеток). Данный способ концентрирования не влиял на степень диссоциации субпопуляции. Использование центробежного метода требует наличия боксированного сепарационного

оборудования с автоклавируемыми узлами (ротор) для обеспечения защиты от контаминации суспензии вакцинного штамма и обеспечения биологической безопасности производственного процесса.

Заключение

Внедрение мембранных технологий очистки воды на этапе приготовления питательных сред для глубинного культивирования микроорганизмов позволило получать воду очищенную фармакопейного качества. Внедрение методов фильтрации с применением современных материалов в процедуру очистки и осветления питательных сред от различных видов загрязнения позволило сократить продолжительность технологической операции, обеспечить высокую степень очистки и снизить потери питательной среды.

Экспериментально обосновано применение метода тангенциальной ультрафильтрации для концентрирования инактивированной суспензии культурального вируса бешенства «Москва 3253_{Verо}» при изготовлении культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов. Найдено, что концентрирование инактивированной суспензии культурального вируса бешенства целесообразно осуществлять с использованием мембран с номинальной отсечкой по молекулярной массе, не превышающей 300 кДа, при величине давления $0,25 \pm 0,01$ МПа. Концентрирование вирусной суспензии тангенциальной ультрафильтрацией позволяет увеличить концентрацию вируса бешенства до уровня

орган-тканевого антигена и повысить иммуногенность культурального антигена.

Концентрирование О-антигена *V. cholerae* М41 серовара Огава ультрафильтрацией в тангенциальном потоке жидкости на плоскорамных элементах дало возможность увеличить выход целевого продукта в 1,5 раза. Разработана технология концентрирования протективных антигенов *V. cholerae* 569В серовара Инаба этим же способом, что дало возможность уменьшения сернокислого аммония в 10 раз и снизить потери в 1,2 раза. Использование мембранных модулей 500 и 50 кДа при концентрировании иммуногенов ХХВ, продуцируемых штаммами холерных вибрионов М41 серовара Огава и 569В серовара Инаба, а также проведение процесса при экспериментально обоснованных барометрических и тепловых параметрах дает возможность обрабатывать производственные объемы продуктов за 5–6 часов. Обосновано использование ультрафильтрации в тангенциальном потоке жидкости на плоскорамных элементах для деминерализации протективных антигенов ХХВ, что позволяет проводить процесс в контролируемых условиях и уменьшить его время с 2–3 дней до 2–3 часов. Разработана технология ультрафильтрационного фракционирования холерогена-анатоксина штамма холерного вибриона 569В Инаба из сепарированной культуральной жидкости. Применение данной технологии позволило сократить продолжительность технологических процедур практически на 60 ч. Разработанные ультрафильтрационные процессы внедрены в промышленную технологию производства ХХВ. Экономическая эффективность производства только за счет уменьшения количества сульфата аммония, используемого для выделения антигенов, составляет до 800000 рублей (в ценах 2020 года).

Экспериментально оценены следующие методы концентрирования биомассы *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ с целью использования в производстве ЖТВ: седиментация, центрифугирование и тангенциальная фильтрация. Сравнительное изучение временных характеристик процессов, свойств полученных концентратов выявило преимущество применения метода тангенциальной фильтрации.

Литература

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — № 2. — С. 95–102.

2. Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Михеева Т.А., Жулидов И.М., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Савицкая Л.В., Селезнева А.Г., Свинцов Р.А., Генералов С.В., Шульгина И.В. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина — итоги первых пяти лет // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 3. — С. 58–62.
3. Абрамова Е.Г., Селезнева А.Г., Жулидов И.М., Свинцов Р.А., Генералов С.В., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К. К вопросу об использовании отечественных фильтрационных материалов в производстве антирабического иммуноглобулина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 1. — С. 15–20.
4. Акинъшина Т.В. Разработка набора реагентов для оценки эффективности поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства в серологических реакциях: дис. ... канд. биол. наук. — Целково, 2005. — 133 с.
5. Антонычева М.В., Волох О.А., Холматов К.И., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В., Никифоров А.К. Технологические особенности фильтрации питательной среды на основе гидролизата фибрина для глубинного культивирования туляремийного микроба / Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. — Иркутск: ИРННТУ, 2015. — С. 187–189.
6. Антонычева М.В., Холматов К.И., Лобовикова О.А., Белоусов А.Д., Чалбушев М.М., Волох О.А. Практика валидации системы получения воды очищенной в производстве холерной вакцины / Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения: Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. — Н.-Новгород: «Ремедиум Приволжье», 2019. — С. 279–284.
7. Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства. Методические указания МУ 3.3.1.1099-2002. — М., 2002. — 28 с.
8. Бибииков Д.Н., Волох О.А., Комиссаров А.В., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Никифоров А.К. Экспериментальная оценка методов концентрирования биомассы *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с целью использования в производстве живой туляремийной вакцины // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2017. — № 2(19). — С. 130–133.
9. Брахт К., Каталевский Е.Е., Савельева С.П. Фильтрация кросс-флоу // Фармацевтические технологии и упаковка. — 2009. — № 6. — С. 47–51.
10. Брок Т. Мембранная фильтрация. — М.: Мир, 1987. — 467 с.
11. Вакцина туляремийная живая. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского

- применения. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9ba98af5-a6d4-4b6f-afd9-5ff24b64bc65&t= (дата обращения 21.03.2031).
12. Вакцина туляремиальная живая. Фармакопейная статья ФС.3.3.1.0019.15 / Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. — М.: 2018.
 13. Вода очищенная. Фармакопейная статья ФС.2.2.0020.18 / Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. — М.: 2018.
 14. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования туляремиального микроба. Патент на изобретение 2518282 РФ.2014.
 15. Гринь С.А. Современные биотехнологические процессы и иммунологические методы при промышленном производстве ветеринарных препаратов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Целково, 2008. — 54 с.
 16. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент на изобретение РФ № 2143280.1999.
 17. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. — М.: ООО «ТиРу», 2012. — 415 с.
 18. Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Бутов А.А., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцин // Проблемы особо опасных инфекций — 2001. — Вып. 2(82). — С. 133–139.
 19. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Высшая школа, 1991. — 288 с.
 20. Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных. Общая фармакопейная статья / Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. — М., 2018.
 21. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Экспериментальная оценка использования метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена в производстве холерной бивалентной химической вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — Вып. 2(108). — С. 83–86.
 22. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Ульянов А.Ю. Разработка экспериментальной технологии концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — Вып. 3(109). — С. 75–77.
 23. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Громова О.В., Перепелица А.И., Никифоров А.К. Способ получения холерогена-анатоксина. Патент на изобретение РФ № 2535122. 2014.
 24. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Перепелица А.И., Громова О.В., Ливанова Л.Ф., Гаева А.В., Никифоров А.К. Фракционирование холерогена-анатоксина холерного вибриона методом тангенциальной фильтрации // Биотехнология. — 2014. — № 3. — С. 34–40.
 25. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Алешина Ю.А., Еремин С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Крайнова А.Г. Способ концентрирования нативного холерного О-антигена *Vibrio cholerae*. Патент на изобретение РФ № 2451522. 2012.
 26. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Перепелица А.И., Еремин С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Волох О.А., Гаева А.В., Ливанова Л.Ф. Аппаратный метод обессоливания антигенных компонентов холерной химической вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. — 2014. — Вып. 4. — С. 61–64.
 27. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллёза, легионеллеза. Методические указания МУ 3.3.2.2124-06. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. — 35 с.
 28. Кузнецова С.В., Исаевич Л.В., Блехерман Б.Е., Кузнецов П.П., Иванов В.С. Получение очищенного и концентрированного культурального вируса бешенства // Вестник сельскохозяйственной науки. — 1981. — № 6(297). — С. 65–70.
 29. Матвеева Ж.В., Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Майоров Н.В. Разработка способа количественной оценки содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2014. — Т. 10. — № 2. — С. 12–17.
 30. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания МУК 4.2.2316-08. — М.: Роспотребнадзор, 2008. — 67 с.
 31. Свитцов А.А. Баромембранные процессы в биотехнологии // Фармацевтические технологии и упаковка. — 2007. — № 4. — С. 18–21.
 32. Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Исрафилов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С., Кунцевич Ю.Г., Петрова И.И. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки. Патент на изобретение РФ № 2322503. 2008.
 33. Холматов К.И., Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В. Валидация технологических процессов

- приготовления питательных сред, используемых в производстве вакцин / Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной. — Н. Новгород: Типография «Растр-НН», 2016. — С. 228–232.
34. Холматов К.И., Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В. Применение фильтроэлементов ЭПВг.П и ЭПМ.К в приготовлении питательных сред при производстве вакцин / Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии: Сборник трудов Международной научно-практической конференции. — Саратов: Саратовский ГАУ, 2017. — С. 222–224.
35. Холматов К.И., Антонычева М.В., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Астафьева С.В. Инновационные способы водоподготовки для приготовления питательных сред / Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Материалы Международной научно-практической конференции. — Саратов: Саратовский ГАУ, 2019. — С. 338–345.
36. Холматов К.И., Антонычева М.В., Волох О.А., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В., Ливанова Л.Ф., Громова О.В., Белякова Н.И. Внедрение современных методов фильтрации в технологии приготовления питательных сред, используемых в производстве холерной вакцины / Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения: Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. — СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2017. — С. 450–451.
37. Холматов К.И., Антонычева М.В., Волох О.А., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Астафьева С.В., Авдеева Н.Г. Применение каскадной фильтрации в приготовлении питательной среды, используемой при глубинном культивировании вакцинного штамма туляремийного микроба / V Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов: Сборник тезисов. — Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2018. — С. 126–128.
38. Atanasiu P., Lepine P., Dighe P. Purification partielle et concentration du virus rabique des rues, culture sur une souche de cellules clonales de rein de hamster // *Comprend Desseans*. — 1973. — Vol. 256. — P. 1415–1417.
39. Jagannathan S., Mani K.R., Vijayakumar R. Analysis of alternative purification of beta-propiolactone inactivated, tangential flow filtration concentrated Vero cell derived rabies vaccine // *Journal of Vaccines & Vaccination*. — 2015. — Vol. 6. — P. 1–6.
40. Mendonça R.Z., Ioshimoto L.M., Mendonça R.M., De-Franco M., Valentini E.J., Beçak W., Raw I., Pereira C.A. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell cultures using a microcarrier system // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. — 1993. — Vol. 26. — No. 12. — P. 1305–1319.
41. Muller R.H. Application of ion exchange resins to the purification of certain viruses // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. — 1950. — Vol. 73. — P. 239–241.
42. Schneider L.G., Horzinek M., Schnell M.J. Purification of rabies virus from tissue culture // *Infectious rabies viruses from cloned cDNA // European Molecular Biology Organization Journal*. — 1994. — Vol. 13. — No. 18. — P. 4195–4203.
43. Sokol F., Kuwert E., Wiktor T.J., Hummeler K., Koprowski H. Purification of rabies virus grown in tissue culture // *Journal of Virology*. — 1968. — Vol. 2. — P. 836–849.
44. Tagawa A., Ozawa W., Kondo A. Studies on purification of rabies virus. Application of methanol precipitation and two other methods // *Yokohama Medical Bulletin*. — 1973. — Vol. 4. — P. 78–86.

References

1. Abramova YeG, Generalov SV, Matveyeva ZhV, Zhulidov IM, Nikiforov AK, Komissarov AV. Eksperimental'noye obosnovaniye vnedreniya kul'tural'nykh tekhnologiy v proizvodstvo antirabicheskogo immunoglobulina. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2016; 2:95–102 (in Russian).
2. Abramova YeG, Nikiforov AK, Lobovikova OA, Yeregin SA, Vasin YuG, Mikheyeva TA, Zhulidov IM, Minayeva LN, Galkina MV, Savitskaya LV, Selezneva AG, Svintsov RA, Generalov SV, Shul'gina IV. Proizvodstvo geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina — itogi pervykh pyati let. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2010; 3:58–62 (in Russian).
3. Abramova YeG, Selezneva AG, Zhulidov IM, Svintsov RA, Generalov SV, Savitskaya LV, Lobovikova OA, Nikiforov AK. K voprosu ob ispol'zovanii otechestvennykh fil'tratsionnykh materialov v proizvodstve antirabicheskogo immunoglobulina. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2018; 14(1):15–20 (in Russian).
4. Akin'shina TV. Razrabotka nabora reagentov dlya otsenki effektivnosti postvaksinal'nogo immuniteta k virusu beshenstva v serologicheskikh reaktsiyakh: dis ... kand biol nauk. Shchelkovo, 2005: 133 (in Russian).
5. Antonycheva MV, Volokh OA, Kholmatorov KI, Avdeyeva NG, Vakhrushina NI, Astaf'yeva SV, Nikiforov AK. Tekhnologicheskiye osobennosti fil'tratsii pitatel'noy sredy na osnove gidrolizata fibrina dlya glubinnogo kul'tivirovaniya tulyaremiynogo mikroba. Fundamental'nyye i prikladnyye aspekty biotekhnologii: Materialy Vserossiyskoy nauchno-

- prakticheskoy konferentsii. Irkutsk: IRNITU, 2015: 187–189 (in Russian).
6. Antonycheva MV, Kholmatov KI, Lobovikova OA, Belousov AD, Chalbushev MM, Volokh OA. Praktika validatsii sistemy polucheniya vody ochishchennoy v proizvodstve kholernoy vaksiny. Nauchnoye obespecheniye protivoepidemicheskoy zashchity naseleniya: aktual'nyye problemy i resheniya: Sbornik nauchnykh trudov Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem. N.-Novgorod: «Remedium Privolzh'ye», 2019: 279–284 (in Russian).
 7. Bezopasnost' raboty s proizvodstvennymi shtammami fiksirovannogo virusa beshenstva. Metodicheskiye ukazaniya MU 3.3.1.1099-2002. Moscow, 2002: 28 (in Russian).
 8. Bibikov DN, Volokh OA, Komissarov AV, Samokhvalova YuI, Avdeyeva NG, Nikiforov AK. Eksperimental'naya otsenka metodov kontsentrirvaniya biomassy *Francisella tularensis* 15 NIEG s tsel'yu ispol'zovaniya v proizvodstve zhivoy tulyaremiynoy vaksiny. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv 2017; 2(19):130–133 (in Russian).
 9. Brakht K, Katalevskiy YeYe, Savel'yeva SP. Fil'tratsiya kross-flou. Farmatsevticheskiye tekhnologii i upakovka 2009; 6:47–51 (in Russian).
 10. Brok T. Membrannaya fil'tratsiya. Moscow: Mir, 1987: 467 (in Russian).
 11. Vaksina tulyaremiynaya zhivaya. Instruktsiya po primeneniyu lekarstvennogo preparata dlya meditsinskogo primeneniya. Gosudarstvennyy reyestr lekarstvennykh sredstv. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9ba98af5-a6d4-4b6f-afd9-5ff24b64bc65&t= (data obrashcheniya 21.03.2031) (in Russian).
 12. Vaksina tulyaremiynaya zhivaya. Farmakopeynaya stat'ya FS.3.3.1.0019.15. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniye. Moscow: 2018 (in Russian).
 13. Voda ochishchennaya. Farmakopeynaya stat'ya FS.2.2.0020.18. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniye. Moscow: 2018 (in Russian).
 14. Volokh OA, Antonycheva MV, Avdeyeva NG, Vakhrushina NI, Nikiforov AK. Pitatel'naya sreda dlya glubinnogo kul'tivirovaniya tulyaremiynogo mikroba. Patent na izobreteniyе 2518282 RF.2014 (in Russian).
 15. Grin' SA. Sovremennyye biotekhnologicheskiye protsessy i immunologicheskiye metody pri promyshlennom proizvodstve veterinarnykh preparatov: avtoref dis ... d-ra biol nauk. Shchelkovo, 2008: 54 (in Russian).
 16. Gromova OV, Dzhaparidze MN, Dyatlov IA, Yelisseyev YuYu, Kireyev MN, Kosmayenko OM. Sposob polucheniya O-antigena kholernogo ochishchennogo. Patent na izobreteniyе RF № 2143280.1999 (in Russian).
 17. Dyatlov IA, Kutuyev VV, Khramov MV. Pitatel'nyye sredy dlya vydeleniya, kul'tivirovaniya i identifikatsii vozбудiteley osobo opasnykh infektsiy bakterial'noy prirody. Moscow: ООО «TiRu», 2012: 415 (in Russian).
 18. Dyatlov IA, Nizhegorodtsev SA, Gromova OV, Vasin YuG, Butov AA, Klokova OD, Belyakova NI. Razrabotka ul'trafil'tratsionnoy tekhnologii polucheniya O-antigena kholernogo vibriona dlya proizvodstva vaksiny. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2001; 2(82):133–139 (in Russian).
 19. Yegorov AM, Osipov AP, Dzantiyev BB, Gavrilova YeM. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza. Moscow: Vysshaya shkola, 1991: 288 (in Russian).
 20. Kolichestvennoye opredeleniye belka kolorimetricheskim metodom s biuretovym reaktivom v preparatakh krovi cheloveka i zhivotnykh. Obshchaya farmakopeynaya stat'ya. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izdaniye. Moscow, 2018 (in Russian).
 21. Komissarov AV, Yeremin SA, Aleshina YuA, Vasin YuG, Klokova OD, Belyakova NI. Eksperimental'naya otsenka ispol'zovaniya metoda ul'trafil'tratsii po printsipu «kross-flou» dlya kontsentrirvaniya O-antigena v proizvodstve kholernoy bivalentnoy khimicheskoy vaksiny. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2011; 2(108):83–86 (in Russian).
 22. Komissarov AV, Yeremin SA, Aleshina YuA, Nikiforov AK, Vasin YuG, Klokova OD, Belyakova NI, Ul'yanov AYu. Razrabotka eksperimental'noy tekhnologii kontsentrirvaniya protektivnykh antigenov shtamma *Vibrio cholerae* 569V Inaba metodom tangentsial'noy ul'trafil'tratsii. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2011; 3(109):75–77 (in Russian).
 23. Komissarov AV, Yeremin SA, Gromova OV, Perepelitsa AI, Nikiforov AK. Sposob polucheniya kholerogena-anatoksina. Patent na izobreteniyе RF № 2535122. 2014 (in Russian).
 24. Komissarov AV, Yeremin SA, Perepelitsa AI, Gromova OV, Livanova LF, Gayeva AV, Nikiforov AK. Fraktsionirovaniye kholerogena-anatoksina kholernogo vibriona metodom tangentsial'noy fil'tratsii. Biotekhnologiya 2014; 3:34–40 (in Russian).
 25. Komissarov AV, Nikiforov AK, Aleshina YuA, Yeremin SA, Gromova OV, Vasin YuG, Klokova OD, Belyakova NI, Kraynova AG. Sposob kontsentrirvaniya nativnogo kholernogo O-antigena *Vibrio cholerae*. Patent na izobreteniyе RF № 2451522. 2012 (in Russian).
 26. Komissarov AV, Nikiforov AK, Perepelitsa AI, Yeremin SA, Gromova OV, Vasin YuG, Volokh OA, Gayeva AV, Livanova LF. Apparatnyy metod obessolivaniya antigennykh komponentov kholernoy khimicheskoy vaksiny. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2014; 4:61–64 (in Russian).
 27. Kontrol' diagnosticheskikh pitatel'nykh sred po biologicheskim pokazatelyam dlya vozбудiteley chumy, kholery, sibirskoy yazvy, tulyaremiy, brutselloza, legionelleza. Metodicheskiye ukazaniya MU 3.3.2.2124-06. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2007: 35 (in Russian).

28. Kuznetsova SV, Isayevich LV, Blekherman BYe, Kuznetsov PP, Ivanov BC. Polucheniye ochishchennogo i kontsentririrovannogo kul'tural'nogo virusa beshenstva. Vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki 1981; 6(297):65–70 (in Russian).
29. Matveyeva ZhV, Abramova YeG, Generalov SV, Mayorov NV. Razrabotka sposoba kolichestvennoy otsenki sodержaniya fiksirovannogo virusa beshenstva shtamma «Moskva 3253» v rabicheskom antigene. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2014; 10(2):12–17 (in Russian).
30. Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred. Metodicheskiye ukazaniya MUK 4.2.2316-08. Moscow: Rospotrebnadzor, 2008: 67 (in Russian).
31. Svitsov AA. Baromembrannyye protsessy v biotekhnologii. Farmatsevticheskiye tekhnologii i upakovka 2007; 4:18–21 (in Russian).
32. Sitnik NP, Zagidullin NV, Israfilov AG, Yenikeyeva LF, Mukhacheva AV, Shafeyeva RS, Kuntsevich YuG, Petrova II. Sposob polucheniya vysokospetsifichnoy geterologichnoy antirabicheskoy syvorotki. Patent na izobreteniyе RF № 2322503. 2008 (in Russian).
33. Kholmatov KI, Antonycheva MV, Belousov AD, Vakhrushina NI, Astaf'yeva SV, Lobovikova OA, Shul'gina IV. Validatsiya tekhnologicheskikh protsessov prigotovleniya pitatel'nykh sred, ispol'zuyemykh v proizvodstve vaktsin. Sovremennyye tekhnologii v epidemiologicheskoy nadzore za aktual'nymi infektsiyami: Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 95-letiyu so dnya rozhdeniya akademika RAMN IN Blokhinoy. Nizhniy Novgorod: Tipografiya «Rastr-NN», 2016: 228–232 (in Russian).
34. Kholmatov K.I., Antonycheva M.V., Belousov A.D., Vakhrushina N.I., Astaf'yeva S.V. Primeneniye fil'troelementov EPVg.P i EPM.K v prigotovlenii pitatel'nykh sred pri proizvodstve vaktsin. Innovatsii v pishchevoy tekhnologii, biotekhnologii i khimii: Sbornik trudov Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Saratov: Saratovskiy GAU, 2017: 222–224 (in Russian).
35. Kholmatov KI, Antonycheva MV, Vakhrushina NI, Belousov AD, Astaf'yeva SV. Innovatsionnyye sposoby vodorodgotovki dlya prigotovleniya pitatel'nykh sred. Aktual'nyye problemy veterinarnoy meditsiny, pishchevykh i biotekhnologii: Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Saratov: Saratovskiy GAU, 2019:338–345 (in Russian).
36. Kholmatov KI, Antonycheva MV, Volokh OA, Belousov AD, Vakhrushina NI, Astaf'yeva SV, Livanova LF, Gromova OV, Belyakova NI. Vnedreniye sovremennykh metodov fil'tratsii v tekhnologii prigotovleniya pitatel'nykh sred, ispol'zuyemykh v proizvodstve kholernoy vaktsiny. Obespecheniye epidemiologicheskogo blagopoluchiya: vyzovy i resheniya: Materialy XI s'yezda Vserossiyskogo nauchno-prakticheskogo obshchestva epidemiologov, mikrobiologov i parazitologov. St. Petersburg: FBUN NII epidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera, 2017: 450–451 (in Russian).
37. Kholmatov KI, Antonycheva MV, Volokh OA, Vakhrushina NI, Belousov AD, Astaf'yeva SV, Avdeyeva NG. Primeneniye kaskadnoy fil'tratsii v prigotovlenii pitatel'noy sredy, ispol'zuyemoy pri glubinnom kul'tivirovanii vaktsinnogo shtamma tulyaremiynogo mikroba. V Mezhdunarodnaya konferentsiya molodykh uchenykh: biotekhnologov, molekulyarnykh biologov i virusologov: Sbornik tezisov. – Novosibirsk: IPTS NGU, 2018: 126–128 (in Russian).
38. Atanasiu P, Lepine P, Dighe P. Purification partielle et concentration du virus rabique des rues, culture sur une souche de cellules clonales de rein de hamster. Comprend Desseans 1973; 256:1415–1417.
39. Jagannathan S, Mani KR, Vijayakumar R. Analysis of alternative purification of beta-propiolactone inactivated, tangential flow filtration concentrated Vero cell derived rabies vaccine. Journal of Vaccines & Vaccination 2015; 6:1–6.
40. Mendonça RZ, Ioshimoto LM, Mendonça RM, De-Franco M, Valentini EJ, Beçak W, Raw I, Pereira CA. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell cultures using a microcarrier system. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1993; 26(12):1305–1319.
41. Muller RH. Application of ion exchange resins to the purification of certain viruses. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1950; 73:239–241.
42. Schneider LG, Horzinek M, Schnell MJ. Purification of rabies virus from tissue culture. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. European Molecular Biology Organization Journal 1994; 13(18):4195–4203.
43. Sokol F, Kuwert E Wiktor TJ, Hummeler K, Koprowski H. Purification of rabies virus grown in tissue culture. Journal of Virology 1968; 2:836–849.
44. Tagawa A, Ozawa W, Kondo A. Studies on purification of rabies virus. Application of methanol precipitation and two other methods. Yokohama Medical Bulletin 1973; 4:78–86.

Список сокращений

- АИГ — антирабический иммуноглобулин,
 ЖТВ — живая туляремийная вакцина,
 ИФА — иммуноферментный анализ,
 КС — коэффициент специфичности,
 НОММ — номинальная отсечка по молекулярной массе,
 ОК — общая концентрация,
 ОП — оптическая плотность,
 ОСО — отраслевой стандартный образец,
 ПЦР — полимеразная цепная реакция,
 ПЭГ — полиэтиленгликоль,
 РДП — реакция диффузионной преципитации,
 ХХВ — холерная химическая вакцина.

MEMBRANE TECHNOLOGIES IN THE PRODUCTION OF IMMUNOBIOLOGICAL DRUGS MANUFACTURED BY FGHI RusRAPI «MICROBE» OF THE ROSPOTREBNADZOR (SUMMARIZING RESEARCH RESULTS)

A.V. KOMISSAROV, E.G. ABRAMOVA, O.A. VOLOKH, M.V. ANTONYCHEVA,
S.V. GENERALOV, I.M. ZHULIDOV, L.V. SAVITSKAYA, A.G. SELEZNEVA, A.Yu. UL'YANOV,
K.I. KHOLMATOV, N.I. VAKHRUSHINA, D.N. BIBIKOV, A.K. NIKIFOROV

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

In the Federal State Institution of Health of the Russian Federation «Microbe», theoretical and experimental studies have been carried out to substantiate the use of membrane technologies at various stages (filtration from impurities, fractionation and concentration) in the production of immunobiological drugs, allowing to increase the efficiency and productivity of processes. The experience of using membrane technologies for water purification at the stage of preparation of nutrient media for deep cultivation of microorganisms is presented. The expediency of the tangential ultrafiltration method for concentrating the culture suspension of the virus fixe strain «Moscow 3253_{Vero}» has been substantiated. It has been shown that it is optimal to use membranes with a nominal cut-off not exceeding 300 kDa at a pressure of 0.25 ± 0.01 MPa. It was confirmed by ELISA that the concentration of the viral yield allowed increasing the concentration of the rabies virus in the cultured rabies antigen to the level of the traditionally used organo-tissue antigen. A number of filtration procedures have been introduced into the technological process for the production of chemical cholera vaccine. Concentration of the O-antigen of *Vibrio cholerae* M41 serovar Ogawa by ultrafiltration in a tangential flow of liquid on flat plate elements made it possible to increase the yield of the target product by 1.5 times. A technology has been developed for concentrating the protective antigens of *V. cholerae* 569B serovar Inaba in the same way, which made it possible to reduce ammonium sulfate by 10 times and reduce losses by 1.2 times. The use of membrane modules of 500 and 50 kDa for the concentration of immunogens of the chemical cholera vaccine produced by *Vibrio cholerae* strains M41 of serovar Ogawa and 569B of serovar Inaba, as well as carrying out the process with experimentally substantiated barometric and thermal parameters, opens up the possibility of processing production volumes of products in 5–6 hours. The use of ultrafiltration in a tangential fluid flow on flat-frame elements for demineralization of protective antigens of a chemical cholera vaccine has been substantiated, which allows the process to be carried out under controlled conditions and to reduce its time from 2–3 days to 2–3 hours. The technology of ultrafiltration fractionation of cholera toxin of *Vibrio cholerae* strain 569B Inaba from the separated culture liquid has been developed. The use of this technology made it possible to reduce the duration of technological procedures by almost 60 hours. The developed ultrafiltration processes have been introduced into the industrial technology for the production of chemical cholera vaccines. The economic efficiency of production only by reducing the amount of ammonium sulfate used to isolate antigens is up to 800,000 rubles (in 2020 prices). The following methods for concentrating the vaccine strain 15 NIEG from *Francisella tularensis* biomass for use in the production of a live vaccine against tularemia were evaluated, including sedimentation, centrifugation, and tangential filtration. A comparative study of the temporal characteristics of the processes, the properties of the obtained concentrates revealed the predominance of the application of the tangential filtration method.

Keywords: baromembrane processes, immunobiological drug, culture media, rabies immunoglobulin, chemical cholera vaccine, live tularemia vaccine, membrane separation methods, tangential filtration, cartridge membrane filter element.

Address:

Komissarov A.V., Dr. Biol. Sci., Prof., Chief Researcher, FGHI RusRAPI «Microbe» of the Rospotrebnadzor,
E-mail: Komissarov-9@yandex.ru

Для цитирования:

Комиссаров А.В., Абрамова Е.Г., Волох О.А., Антоньчева М.В., Генералов С.В., Жулидов И.М., Савицкая Л.В., Селезнева А.Г., Ульянов А.Ю., Холматов К.И., Вахрушина Н.И., Бибииков Д.Н., Никифоров А.К. Мембранные технологии в производствах иммунобиологических лекарственных препаратов, выпускаемых ФКУЗ Роснипчи «Микроб» Роспотребнадзора (подведение итогов исследований). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):26–46.

For citation:

Komissarov A.V., Abramova E.G., Volokh O.A., Antonycheva M.V., Generalov S.V., Zhulidov I.M., Savitskaya L.V., Selezneva A.G., Ul'yanov A.Yu., Kholmatov K.I., Vakhrushina N.I., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Membrane technologies in the production of immunobiological drugs manufactured by FGHI RusRAPI «Microbe» of the Rospotrebnadzor (summarizing research results). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):26–46 (in Russian).

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ФИКОЦИАНИНА ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

О.А. МАНЖЕЛЕЙ¹, Е.А. УСТИНОВА², Д.В. СУХИНОВ^{1,2}, Я.Э. СЕРГЕЕВА^{1*}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

² Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Москва

Фикоцианин — натуральный пигмент-белковый комплекс, синтезируемый в клетках некоторых цианобактерий. Обладая уникальными свойствами (привлекательный синий цвет, высокая биологическая активность), фикоцианин нашел широкое применение в различных областях, в том числе в пищевой и косметической промышленности. Использование ФЦ в качестве натурального красителя и ингредиента пищевых и косметических продуктов требует детальных знаний о его стабильности для оптимизации технологий промышленного производства, упаковки и хранения. Данные исследования направлены на изучение термостабильности экстрактов фикоцианина (пищевой/косметической чистоты), полученных из биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619 при использовании различных экстрагентов. Согласно полученным результатам, максимальная термостабильность раствора фикоцианина была достигнута при использовании натрий-фосфатного буфера с рН 6,0.

Ключевые слова: *Arthrospira platensis*, фикоцианин, термостабильность.

Введение

Фикоцианин (ФЦ) — это ярко-синий пигмент-белковый комплекс, содержащийся в тилакоидах клеток некоторых цианобактерий. В последнее время интерес к ФЦ неуклонно растет. На данный момент ФЦ — единственный природный краситель синего цвета, разрешенный к применению для пищевых продуктов [11, 14]. Кроме того, ФЦ обладает флуоресцентными свойствами, вследствие чего он используется в качестве флуоресцентного зонда или флуоресцентного индикатора в медицинской диагностике и прочих исследованиях. ФЦ — нетоксичный фотосенсибилизатор, который можно использовать в качестве адъюванта при фотодинамической терапии. Согласно литературным данным [2, 6, 14, 23, 25, 26, 28] ФЦ обладает противоопухолевым, противодиабетическим, гепатопротекторным и нейропротекторным действием, что в основном связано с его сильной антиоксидантной активностью. Доказано, что ФЦ защищает от диабетической, а также от цисплатин-индуцированной нефротоксичности путем ингибирования окислительного стресса и активации антиоксидантных

ферментов. Защитные эффекты ФЦ при ишемии/реперфузии сердечных дисфункций и повреждений печени также были продемонстрированы благодаря его мощному антиоксидантному профилю наряду с антиапоптозной активностью. Известно, что за счет своего комбинированного действия усиленных антиоксидантных, нейротрофических и противовоспалительных механизмов ФЦ стимулирует окисленные астроциты для защиты и восстановления ишемического мозга. Таким образом, вышеперечисленные факторы приводят к ежегодному росту мирового рынка ФЦ, причем, по прогнозам [24], данная тенденция продолжится как минимум до 2028 года.

ФЦ, вспомогательный пигмент хлорофилла, представляет собой пигмент-белковый комплекс семейства фикобилипротеинов, который образован гомологичными α - и β -субъединицами и линейным тетрапиррольным фикоцианобилином (ФЦБ), ковалентно связанным с полипептидами через тиоэфирную связь с остатком цистеина [24]. α -субъединица содержит 1 ФЦБ, а β -субъединица — 2 ФЦБ [21]. Субъединицы кодируются разными генами, однако их аминокислотная последовательность, а также вторичная и третичная структуры весьма схожи [21, 22]. Незначительные различия в аминокислотном составе влияют на стабильность и структурные свойства этих белков. ФЦ, выделенный из термофилов, обычно более стабилен, чем ФЦ мезофилов [15]. В клетке α - и β -субъединицы спонтанно объединяются в гетеродимер ($\alpha\beta$), который может образовывать тримерную ($\alpha\beta$)₃ и гексамерную ($\alpha\beta$)₆ формы, которые, в свою очередь, об-

© 2021 г. Манжелей О.А., Устинова Е.А., Сухинов Д.В., Сергеева Я.Э.

* Автор для переписки:

Сергеева Яна Эдуардовна

старший научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский институт», отдел биотехнологии и биоэнергетики.

E-mail: yanaes2005@gmail.com

разуют светособирающие стержни фикобилисом (ФБС). Следует отметить, что структура белковой части влияет на конформацию ФЦБ [16]. Стадия агрегации влияет на молекулярную массу, положение и интенсивность максимума поглощения ФЦ. Поэтому спектр поглощения ФЦ может меняться в зависимости от рН, ионной силы среды, концентрации белка. Нужно также указать на то, что в процессе выделения ФЦ соотношение тримерной и гексамерной форм зависит от типа используемого экстрагента и способа экстракции [8, 19].

Получение неочищенного ФЦ является довольно простой, хотя и энергозатратной технологией. ФЦ возможно использовать в различных отраслях промышленности в зависимости от конкретного технологического процесса как в жидкой форме, так и в виде порошка. Порошок удобнее хранить и перевозить, однако в ряде случаев в производстве необходимо использовать именно раствор ФЦ. Применение ФЦ сильно ограничено из-за чувствительности белковой части фикобилипротеина к различным денатурирующим факторам, что приводит к осаждению белка и потере цвета [10]. Согласно данным литературы, на процесс разложения ФЦ влияет ряд факторов: тип, рН и ионная сила экстрагента, концентрация фикобилипротеина, температура и воздействие света [9, 16]. Последние два фактора особенно важны при хранении и раствора, и порошка ФЦ. Наиболее распространёнными экстрагентами, используемыми для экстракции и хранения ФЦ, являются натрий-фосфатный и цитратно-фосфатный буферы, а также деионизированная вода MilliQ [10, 22]. В связи с этим при хранении и использовании ФЦ в пищевой и косметической промышленности, где зачастую технологический процесс подразумевает нагрев, необходимо учитывать термостабильность экстракта ФЦ.

Цель данной работы — изучение термостабильности первичных экстрактов ФЦ при использовании различных экстрагентов.

Материалы и методы

Объект исследования: цианобактерия *Arthrospira platensis* В-12619 (ВКПМ).

Культивирование проводилось в шейкере термостате Eppendorf New Brunswick Innova 42/42R при постоянном перемешивании (140 об/мин) и круглосуточном освещении 80 мкмоль/(м²·с) при 30 °С в колбах Эрленмейера рабочим объемом 1 л с 300 мл модифицированной среды Заррука [12, 13], начальное значение OD_{750} $0,050 \pm 0,005$.

Контроль роста осуществляли определением оптической плотности суспензии клеток при 750 нм (спектрофотометре ThermoScientific Genesys 10S UV-Vis, США) и величины рН (рН-метр MettlerToledo S220-Kit, США).

Сбор биомассы проводили центрифугированием (7500 об/мин, 10 мин), дважды промывали дистиллированной водой.

Получение неочищенного экстракта: исчерпывающую экстракцию фикоцианина из предварительно обработанной (трехкратный цикл замораживания/оттаивания) влажной биомассы проводили при 4 °С различными экстрагентами: деионизированная вода MilliQ (ДИ), цитратно-фосфатный буфер (ЦФБ, рН 6,0 и 7,0) и натрий-фосфатный буфер (ФБ, рН 6,0 и 7,0). Осаждение биомассы осуществляли центрифугированием (12500 об/мин, 15 мин) [1].

Определение термостабильности проводили при термостатировании (40 или 60 °С) изучаемых растворов фикоцианина на водяной бане с отбором аликвот через указанные промежутки времени. Во всех исследованиях начальная величина OD_{620} составляла $1,000 \pm 0,004$.

По окончании термостатирования исследуемые растворы выдерживали на ледяной бане в течение 10 мин. Спектры поглощения растворов снимали при достижении комнатной температуры.

Количественное определение фикоцианина. Спектр поглощения фикоцианина снимали на спектрофотометре ThermoScientific Genesys 10S UV-Vis, США.

Концентрацию ФЦ определяли по формуле [4]:

$$C - PC \left(\frac{MГ}{MЛ} \right) = \frac{A_{max} - 0,474 \times A_{650}}{5,34},$$

где A_{λ} — оптическая плотность при λ нм, A_{max} — оптическая плотность максимума поглощения при 620 нм для ФБ и 618 — для ЦФБ и ДИ.

Чистоту ФЦ определяли по формуле [7]:

$$\text{Чистота} = \frac{A_{max}}{A_{280}},$$

где A_{λ} — оптическая плотность при λ нм, A_{max} — оптическая плотность максимума поглощения при 620 нм для ФБ и 618 — для ЦФБ и ДИ соответственно.

Стабильность фикоцианина оценивали при определении относительной (остаточной) концентрации (C_R , %), рассчитанной по уравнению [3]:

$$CR(\%) = \frac{C}{C_0} \times 100,$$

где C_0 и C — начальная и текущая концентрации ФЦ соответственно.

Результаты и обсуждение

Определена термостабильность неочищенных (crude) экстрактов ФЦ, полученных при использовании различных экстрагентов: деионизированной воды MilliQ, цитратно-фосфатного (рН 6,0 и 7,0) и натрий-фосфатного (рН 6,0 и 7,0) буферов при двух температурных режимах (40 и 60 °С). Чистота ФЦ в исходных экстрактах составляла от 1,4 до 1,6.

Экстракция является ключевым этапом получения ФЦ из биомассы цианобактерий [18], на эффективность которого влияет ряд факторов, в том числе и величина рН экстрагента. По литературным сведениям [20, 29], величина рН является одним из основных факторов, контролирующих агрегацию и диссоциацию ФЦ с образованием мономеров, тримеров, гексамеров. Также с величиной рН может быть связана и растворимость [29].

На рисунке 1а в качестве примера приведены спектры поглощения как исходного экстракта в ФБ рН 7,0, так и после 60-минутного термостатирования при двух температурах. На рисунке 1б и 1в показано снижение интенсивности максимума поглощения при 620 нм в течение 60 мин при 40 и 60 °С соответственно.

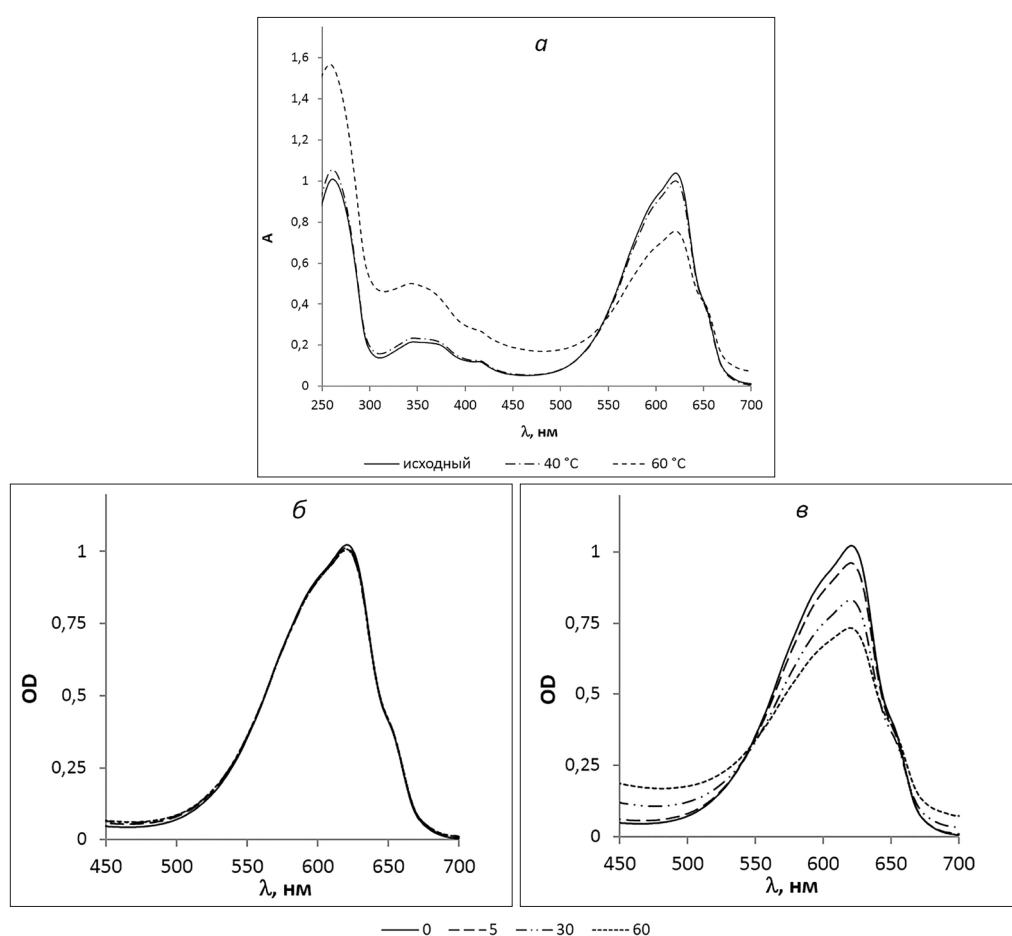


Рис. 1. Спектр поглощения неочищенного исходного экстракта фикоцианина и через 60 мин термостатирования при 40 и 60 °С (а); изменение интенсивности максимума поглощения при 620 нм в процессе термостатирования при 40 (б) и 60 °С (в). Все спектры сняты в ФБ рН 7,0

Спектр поглощения ФЦ определяется конформацией хромофора фикоцианобилина. Так, когда фикоцианобилин связан с белковой частью, хромофор вынужден принимать растянутую конформацию [27], что обуславливает характерные спектроскопические свойства за счет системы протяженных двойных связей, образованных

фикоцианобилином и белком. Спектр поглощения в ФБ характеризуется максимумом поглощения при 620 нм, в ЦФБ и ДИ — 618 нм. В случае нарушения структуры белка (денатурация белка) происходит нарушение стабилизирующих связей между хромофором и белком, что приводит к переходу (перестройке) в более энергетически

выгодную, стабильную циклическую конформацию хромофора, которая характеризуется основным максимумом поглощения при 360 нм [5].

Как видно из рисунка 1, исходный экстракт ФЦ (сплошная линия), не подвергшийся термической обработке, имел два основных максимума поглощения в области 280 нм (белковая часть ФЦ) и 620 нм (хромофорная группа ФЦ), а также небольшое плечо при 650 нм, свидетельствующее о присутствии следовых количеств аллофикоцианина, и второстепенный локальный максимум при 360 нм.

При 40 °С профиль спектра оставался практически неизменным. При повышении температуры до 60 °С интенсивность максимума поглощения при 620 нм уменьшалась, в то время как при 280 и 360 нм — увели-

чивалась, что свидетельствовало о нарушении вторичной, третичной или четвертичной структур апопротеина, которое, в свою очередь, приводило к перестройке линейной структуры хромофора в циклическую [17].

Отмеченные изменения в спектре сопровождались и потерей цвета раствора экстракта ФЦ.

На рисунке 2 представлены результаты определения термостабильности всех исследованных экстрактов. Как видно из рисунка 2а, все исследованные экстракты при 40 °С, независимо от типа экстрагента и величины рН, стабильны. Тогда как при температуре 60 °С более стабильны растворы, полученные при использовании в качестве экстрагентов деионизированной воды MilliQ и обоих буферов с рН 6,0 (рис. 2б).

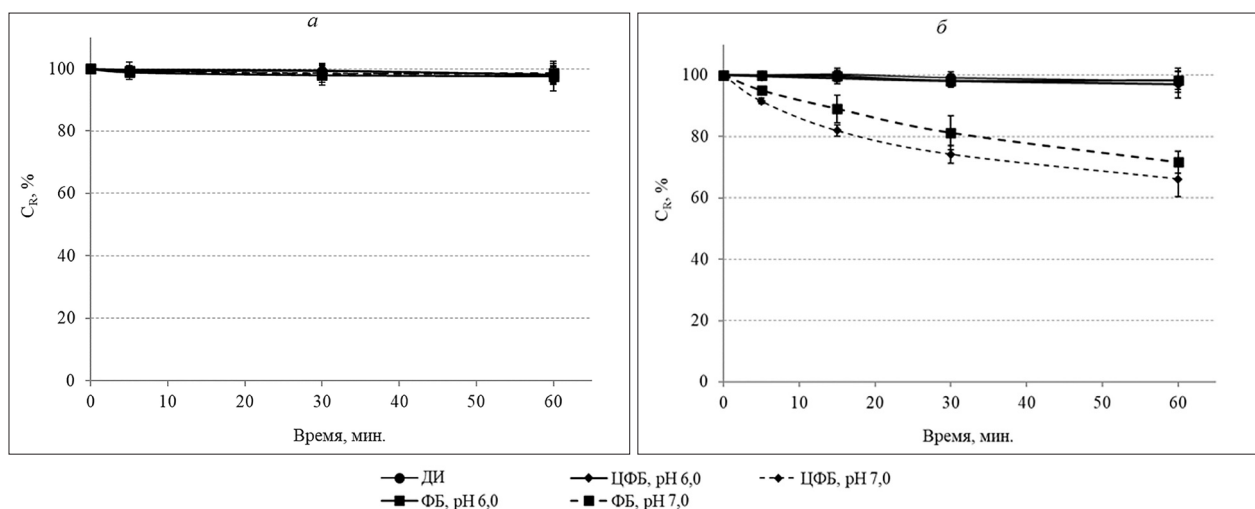


Рис. 2. Термостабильность экстрактов фикоцианина при 40 (а) и 60 °С (б)

При 60 °С значения остаточной концентрации (C_R) ФЦ в вариантах ДИ, ЦФБ (рН 6,0) и ФБ (рН 6,0) через 60 минут составили 98,2, 97,0 и 98,3% от начальных значений соответственно. При использовании буферов с рН 7,0 величина остаточной концентрации составила для ЦФБ и ФБ 66,1 и 71,6% соответственно.

Следовательно, анализ термостабильности экстрактов ФЦ, полученных при экстракции различными буферами и ДИ, при температурах 40 и 60 °С продемонстрировал, что на стабильность структуры белковой части ФЦ, судя по остаточной концентрации, влияет не столько тип экстрагента и его ионная сила, сколько величина рН. Хотя использование ФБ вместо ЦФБ может незначительно, но улучшить термостабильность экстракта и при рН 7,0.

На рисунке 3 видно изменение чистоты ФЦ при его термической дегградации. Из представленных данных следует, что, несмотря на то, что все экстракты были стабильны в процессе термостатирования при 40 °С, их чистота все равно снижалась. Так, для ЦФБ после

термостатирования чистота снизилась на 11,3 и 18,0% для значений рН 6,0 и 7,0 соответственно, а для ФБ на 1,5 и 6,4% — для значений рН 6,0 и 7,0. Для ДИ это значение составило 5,7%.

Аналогичное распределение отмечено и при термостатировании при 60 °С. Так, для ЦФБ относительное снижение чистоты составило 58,7% (рН 6,0) и 60,0% (рН 7,0), тогда как для ФБ 50,1% (рН 6,0) и 53,9% (рН 7,0), а для ДИ — 54,8%.

Итак, сравнивая результаты измерения чистоты экстрактов ФЦ, можно сделать вывод о том, что рН 6,0 вне зависимости от типа буфера является предпочтительным, что явно видно по результатам термостатирования при 40 °С, но менее выражено при 60 °С. Результаты, полученные для ДИ, сходны с данными для ФБ рН 7,0. Если сравнивать результаты, полученные для разных экстрагентов, то данные, представленные на рисунке 3, соответствуют данным по остаточной концентрации. Это еще раз подтверждает, что использование ФБ предпочтительнее.

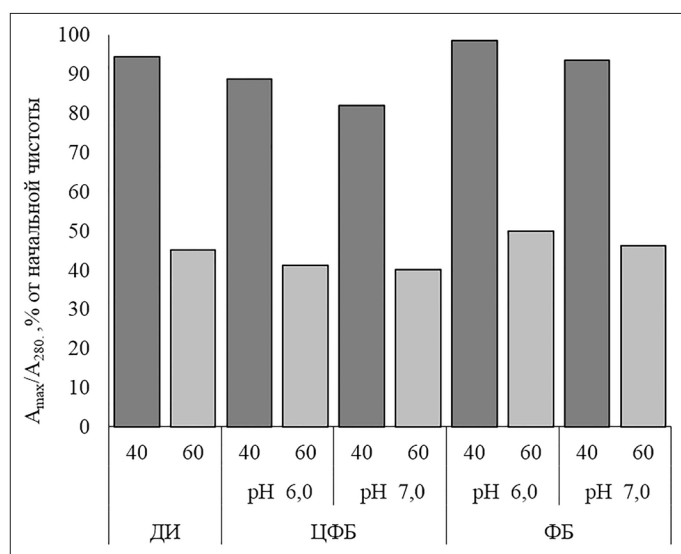


Рис. 3. Изменение чистоты экстрактов фикоцианина при термостатировании (40 и 60 °C в течение 60 минут). Данные представлены в относительных величинах (% от начальной чистоты)

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований была изучена термостабильность первичных экстрактов ФЦ, полученных различными экстрагентами, при двух температурных режимах (40 и 60 °C).

Было установлено, что с точки зрения термостабильности оптимальным является использование натрий-фосфатного буфера pH 6,0. При использовании этого же буфера, но с другим pH (pH 7,0) или замене экстрагента на цитратно-фосфатный буфер (pH 6,0 и 7,0) или деионизированную воду MilliQ термостабильность ФЦ снижается.

Литература

1. Труфанова А.С., Бабиченко Н.П., Сергеева Я.Э. Оптимизация процесса выделения фикоцианина из цианобактерии *Arthrospira platensis* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15(4). — С. 11–16.
2. Agrawal M., Bansal S., Chopra K. Evaluation of the in vitro and in vivo antioxidant potentials of food grade Phycocyanin // Journal of Food Science and Technology. — 2021. — P. 1–9. doi: 10.1007/s13197-020-04922-4.
3. Antelo F.S., Costa J.A.V., Kalil S.J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis* // Biochemical Engineering Journal. — 2008. — Vol. 41(1). — P. 43–47.
4. Bennett A., Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga // Journal of Cell Biology. — 1973. — Vol. 58(2). — P. 419–435.

5. Berns D.S., MacColl R. Phycocyanin in physical-chemical studies // Chemical Reviews. — 1989. — Vol. 89(4). — P. 807–825.
6. Bhat V.B., Madyastha K.M. C-Phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2000. — Vol. 275(1). — P. 20–25.
7. Boussiba S., Richmond A.E. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis* // Archives of Microbiology. — 1979. — Vol. 120(2). — P. 155–159.
8. Bryant D.A. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria // Journal of General Microbiology. — 1982. — Vol. 128(4). — P. 835–844.
9. Buchweitz M. Natural Solutions for Blue Colors in Food // In Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color. — 2016. — P. 355–384. doi: 10.1016/B978-0-08-100371-8.00017-8.
10. Chaiklahan R., Chirasuwan N., Bunnag B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives // Process Biochemistry. — 2012. — Vol. 47(4). — P. 659–664.
11. Chen X., Wu M., Yang Q., Wang S. Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system // LWT – Food Science and Technology. — 2017. — Vol. 77. — P. 468–474.
12. Cogne G., Lehmann B., Dussap C., Gros, J. Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: Culture medium optimization // Biotechnology and Bioengineering. — 2003. — Vol. 81(5). — P. 588–593.
13. Cornet J.F., Dussap C.G., Cluzel P., Dubertret G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations // Biotechnology and Bioengineering. — 1992. — Vol. 40(7). — P. 826–834.
14. Fernández-Rojas B., Hernández-Juárez J., Pedraza-Chaverri J. Nutraceutical properties of phycocyanin // Journal of Functional Foods. — 2014. — Vol. 11(C). — P. 375–392.
15. Ferraro G., Imbimbo P., Marseglia A., Illiano A., Fontanarosa C., Amoresano A., Olivieri G., Pollio A., Monti D.M., Merlino A. A thermophilic C-phycocyanin with unprecedented biophysical and biochemical properties // International Journal of Biological Macromolecules. — 2020. — Vol. 150. — P. 38–51.
16. Hsieh-Lo M., Castillo G., Ochoa-Becerra M. A., Mojica L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability // Algal Research. — 2019. — Vol. 42. — P. 101600. doi: 10.1016/j.algal.2019.101600.
17. MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes // Journal of Structural Biology. — 1998. — Vol. 124(2–3). — P. 311–334.
18. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent // Biochemical Engineering Journal. — 2016. — Vol. 109. — P. 282–296.

19. Morançais M., Mouget J.L., Dumay J. Proteins and pigments // *Microalgae in Health and disease Prevention*. — 2018. — P. 145–175. doi: 10.1016/B978-0-12-811405-6.00007-4.
20. Niu J.F., Wang G.C., Lin X., Zhou B.C. Large-scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. — 2007. — Vol. 850(1–2). — P. 267–276.
21. Padyana A.K., Bhat V.B., Madyastha K.M., Rajashankar K.R., Ramakumar S. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2001. — Vol. 282(4). — P. 893–898.
22. Pagels F., Guedes A.C., Amaro H.M., Kijjoo A., Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications // *Biotechnology Advances*. — 2019. — Vol. 37(3). — P. 422–443.
23. Patel H.M., Rastogi R.P., Trivedi U., Madamwar D. Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM // *Algal Research*. — 2018. — Vol. 32. — P. 372–383.
24. Phycocyanin Market: Food & Beverage Application to Hold Close to 85% Value Share Throughout the Forecast Period: Global Industry Analysis (2013–2017) & Opportunity Assessment (2018–2028) [Electronic resource]. URL: <https://www.reportlinker.com/p05503677/Phycocyanin-Market-Food-Beverage-Application-to-Hold-Close-to-85-Value-Share-Throughout-the-Forecast-Period-Global-Industry-Analysis-Opportunity-Assessment.html>.
25. Prabakaran G., Sampathkumar P., Kavisri M., Moovendhan M. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and anti-inflammatory effect // *International Journal of Biological Macromolecules*. — 2020. — Vol. 153. — P. 256–263.
26. Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D., Rimbau V. C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects // *Current Protein & Peptide Science*. — 2003. — Vol. 4(3). — P. 207–216.
27. Schirmer T., Bode W., Huber R. Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phycoerythrins at 2.1 and 2.5 Å resolution. A common principle of phycobilin-protein interaction // *Journal of Molecular Biology*. — 1987. — Vol. 196(3). — P. 677–695.
28. Sonani R.R., Patel S., Bhastana B., Jakharia K., Chaubey M.G., Singh N.K., Madamwar D. Purification and antioxidant activity of phycocyanin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site // *Bioresource Technology*. — 2017. — Vol. 245. — P. 325–331.
29. Vali Aftari R., Rezaei K., Mortazavi A., Bandani A.R. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycoerythrin: A comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods // *Journal of Food Processing and Preservation*. — 2015. — Vol. 39(6). — P. 3080–3091.

References

1. Trufanova AS, Babichenko NP, Sergeeva YaE. Optimizatsiya protsessy vydeleniya fikotsianina iz tsianobakterii *Arthrospira platensis*. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova* 2019; 15(4):11–16 (in Russian).
2. Agrawal M, Bansal S, Chopra K. Evaluation of the in vitro and in vivo antioxidant potentials of food grade Phycocyanin. *Journal of Food Science and Technology* 2021; 1–9. doi: 10.1007/s13197-020-04922-4.
3. Antelo FS, Costa JAV, Kalil SJ. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 2008; 41(1):43–47.
4. Bennett A, Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology* 1973; 58(2):419–435.
5. Berns DS, MacColl R. Phycocyanin in physical-chemical studies. *Chemical Reviews* 1989; 89(4):807–825.
6. Bhat VB, Madyastha KM. C-Phycocyanin: A potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 275(1):20–25.
7. Boussiba S, Richmond AE. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* 1979; 120(2):155–159.
8. Bryant DA. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 1982; 128(4):835–844.
9. Buchweitz M. Natural Solutions for Blue Colors in Food. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color* 2016: 355–384. doi: 10.1016/B978-0-08-100371-8.00017-8.
10. Chaiklahan R, Chirasuwan N, Bunnag B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry* 2012; 47(4):659–664.
11. Chen X, Wu M, Yang Q, Wang S. Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. *LWT – Food Science and Technology* 2017; 77:468–474.
12. Cogne G, Lehmann B, Dussap C, Gros J. Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: Culture medium optimization. *Biotechnology and Bioengineering* 2003; 81(5):588–593.
13. Cornet JF, Dussap CG, Cluzel P, Dubertret G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnology and Bioengineering* 1992; 40(7):826–834.
14. Fernández-Rojas B, Hernández-Juárez J, Pedraza-Chaverri J. Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods* 2014; 11(C):375–392.

15. Ferraro G, Imbimbo P, Marseglia A, Illiano A, Fontanarosa C, Amoresano A, Olivieri G, Pollio A, Monti DM, Merlino A. A thermophilic C-phycocyanin with unprecedented biophysical and biochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020; 150:38–51.
16. Hsieh-Lo M., Castillo G., Ochoa-Becerra M. A., Mojica L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research* 2019; 42:101600. doi: 10.1016/j.algal.2019.101600.
17. MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology* 1998; 124(2–3):311–334.
18. Manirafasha E, Ndikubwimana T, Zeng X, Lu Y, Jing K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal* 2016; 109:282–296.
19. Moranças M, Mouget JL, Dumay J. Proteins and pigments. *Microalgae in Health and disease Prevention* 2018: 145–175. doi: 10.1016/B978-0-12-811405-6.00007-4.
20. Niu JF, Wang GC, Lin X, Zhou BC. Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007; 850(1–2):267–276.
21. Padyana AK, Bhat VB, Madyastha KM, Rajashankar KR, Ramakumar S. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 282(4):893–898.
22. Pagels F, Guedes AC, Amaro HM, Kijjoa A, Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 2019; 37(3):422–443.
23. Patel HM, Rastogi RP, Trivedi U, Madamwar D. Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. *Algal Research* 2018; 32:372–383.
24. Phycocyanin Market: Food & Beverage Application to Hold Close to 85% Value Share Throughout the Forecast Period: Global Industry Analysis (2013–2017) & Opportunity Assessment (2018–2028) [Electronic resource]. URL: <https://www.reportlinker.com/p05503677/Phycocyanin-Market-Food-Beverage-Application-to-Hold-Close-to-85-Value-Share-Throughout-the-Forecast-Period-Global-Industry-Analysis-Opportunity-Assessment.html>.
25. Prabakaran G, Sampathkumar P, Kavisri M, Moovendhan M. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020; 153:256–263.
26. Romay C, Gonzalez R, Ledon N, Ramirez D, Rimbau V. C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein & Peptide Science* 2003; 4(3):207–216.
27. Schirmer T, Bode W, Huber R. Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å resolution. A common principle of phycobilin-protein interaction. *Journal of Molecular Biology* 1987; 196(3):677–695.
28. Sonani RR, Patel S, Bhastana B, Jakharia K, Chaubey MG, Singh NK, Madamwar D. Purification and antioxidant activity of phycocyanin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site. *Bioresource Technology* 2017; 245:325–331.
29. Vali Aftari R, Rezaei K, Mortazavi A, Bandani AR. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycocyanin: A comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods. *Journal of Food Processing and Preservation* 2015; 39(6):3080–3091.

STUDY OF THE THERMOSTABILITY OF CYANOBACTERIUM *ARTHROSPIRA PLATENSIS* PHYCOCYANIN

O.A. MANZHELEY¹, E.A. USTINOVA², D.V. SUKHINOV^{1,2}, Ya.E. SERGEEVA¹

¹ National Research Centre «Kurchatov institute»,

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow

Phycocyanin (PhC) is a natural pigment-protein complex synthesized in the cells of some cyanobacteria species. Possessing unique properties (attractive blue color, high biological activity), phycocyanin has found a wide application in various fields, including in the food and cosmetic industries. The use of PhC as a natural dye and ingredient in the food and cosmetic products requires detailed knowledge of its stability to optimize industrial production, packaging and storage technologies. These studies are aimed at studying the thermal stability of phycocyanin extracts (food/cosmetic grade) obtained from the biomass of the cyanobacteria *Arthrospira platensis* B-12619 using various extractants. According to the results obtained, the maximum thermal stability of the phycocyanin solution was achieved using sodium phosphate buffer with a pH of 6,0.

Keywords: *Arthrospira platensis*, phycocyanin, thermostability.

Address:

Sergeeva Y.E.
Senior Researcher, National Research Center «Kurchatov Institute»,
Department of Biotechnology and Bioenergy.
E-mail: yanaes2005@gmail.com

Для цитирования:

Манжелей О.А., Устинова Е.А., Сухинов Д.В., Сергеева Я.Э. Исследование термостабильности фикоцианина цианобактерии *Arthrospira platensis*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):47–54.

For citation:

Manzheley O.A., Ustinova E.A., Sukhinov D.V., Sergeeva Ya.E. Study of the thermostability of cyanobacterium *Arthrospira platensis* phycocyanin. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):47–54 (in Russian).

ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ И МЕСТНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПОЛОСТИ РТА И ЖЕЛУДКА У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ БЕЗ И ПОСЛЕ ПРИЕМА АНТИБИОТИКОВ И ПРОБИОТИКОВ

О.А. ПЕТРОВА*, В.М. ЧЕРВИНЕЦ, Ю.В. ЧЕРВИНЕЦ

Тверской государственный медицинский университет, Тверь

В работе ставилась цель — провести мониторинг состава микрофлоры ротовой жидкости, содержимого желудка у недоношенных новорожденных детей без и после приема антибиотиков и пробиотиков, а также определить количество лизоцима ротовой жидкости у доношенных и недоношенных новорожденных. В исследование включены 30 недоношенных детей, не получавших антибиотики и пробиотики, 30 недоношенных новорожденных детей — после приема пробиотиков и 30 — после назначения антибиотиков. Бактериологическое исследование проводили с применением оптимальных питательных сред (HiMedia) и идентификационных систем (bioMérieux Vitek, Inc). Выявлено, что в ротовой жидкости у недоношенных детей, получавших антибиотики, выделение лактобацилл возрастало в 7,8 раза и в 3 раза — при применении пробиотиков. После курса антибиотиков увеличивалась частота выделения *Clostridium* spp. в 6 раз, *Veillonella* spp. — в 5 раз, *Candida albicans* — в 3 раза, *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp. — в 2 раза. На фоне применения антибиотиков и пробиотиков золотистый стафилококк выделялся в 2–2,5 раза реже. Приведены также данные о микрофлоре желудка, полученные по сходному методу. Изучен уровень лизоцима в ротовой жидкости у недоношенных детей (он снижается после приема антибиотиков и пробиотиков в 2–3 раза).

Ключевые слова: микробиота, новорожденные, антибиотики, пробиотики, лизоцим.

Введение

Микробиом различных биотипов новорожденного ребенка оказывает влияние на развивающуюся иммунную систему [14, 15, 26]. В микробиоте полости рта преобладали *Firmicutes*, *Proteobacteria* [21], *Epsilonbacteraota* и *Fusobacteria* и семейства *Streptococcaceae* [20, 27]. У недоношенных по сравнению с доношенными детьми чаще изолировались роды *Stenotrophomonas* и *Enterobacter* [16]. Состав микробиома содержимого желудка у недоношенных существенно отличается от доношенных детей [13], у которых преобладают лактобациллы, *Escherichia/Shigella* и *Clostridium sensu stricto* [25]. Первоначальный процесс колонизации микроорганизмами сложнее протекает у недоношенных новорожденных из-за незрелости органов, частого использования антибиотиков и парентерального питания [12].

У новорожденных детей на фоне применения антибактериальной терапии выявлялись микроорганизмы родов *Enterococcus*, *Staphylococcus* и *Lactobacillus*,

среди грамотрицательных бактерий — *Klebsiella*, *Serratia* и *Escherichia*. Преобладали виды *E. faecalis* и *Staphylococcus epidermidis*, менее выражены *Serratia marcescens*, *E. coli* и *K. pneumoniae* [19]. В небольшом количестве — *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella* и *Prevotella* [11].

На фоне инфекционного процесса (сепсис) выявили постоянное присутствие стафилококков (*S. epidermidis*, *S. aureus*), энтерококков (*E. faecalis*, *Enterococcus faecium*) и бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* и т.д.) [17, 18].

У младенцев в пищеварительной системе отмечается малое количество лактобацилл, большое количество грамотрицательных (культивируемых) бактерий, в том числе *Escherichia coli*, *Klebsiella* [4]. Такие дисбиотические нарушения требуют проведения коррекции. Ведущая роль в нормализации состава и функций микрофлоры принадлежит пробиотикам [3, 5, 6, 16]. Пробиотики нового поколения способны проявлять не только антагонизм в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры, но и продуцировать рекомбинантные человеческие белки — цитокины, ферменты, антитела. Пробиотики, используемые в клинической практике, должны быть стандартизированы

© 2021 г. Петрова О.А., Червинец В.М., Червинец Ю.В.

* Автор для переписки:

Петрова Ольга Александровна

аспирант кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии; ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава РФ

E-mail: ollgap@mail.ru

[8] и обеспечивать снижение частоты пищеварительных дисфункций у недоношенных пациентов [1].

Однако имеется мало данных о динамике изменения микробиома полости рта и желудка недоношенных новорожденных детей на фоне применения антибиотиков и пробиотиков. Отсутствуют сведения о неспецифических факторах гуморального иммунитета.

Цель настоящего исследования — провести мониторинг состава микрофлоры ротовой жидкости, содержимого желудка у недоношенных новорожденных детей без и после приема антибиотиков и пробиотиков. Определить также количества лизоцима ротовой жидкости у доношенных и недоношенных новорожденных.

Материалы и методы

Проведено исследование микрофлоры указанных биотопов: у 30 недоношенных детей, не получавших антибиотиков и пробиотиков, в первые 5 суток жизни ребенка (1-я группа); 30 недоношенных новорожденных детей, получавших пробиотики (2-я группа); 30 недоношенных новорожденных детей после курса антибактериальной терапии (3-я группа).

Во 2-й группе забор материала проводился на фоне приема пробиотика в течение не менее 5 дней. 90% детей принимали бифидумбактерин 5 доз ежедневно, 5% биогай (пробиотик, содержащий *Lactobacilli reuteri Protectis*), 4% ленекс (эубиотик) и 1% нормабакт (БАД-симбиотик (про+пребиотик)). Пробиотики и пребиотики назначаются с целью снижения риска энтероколита у недоношенных детей и при коррекции дисбиотических расстройств. (От февраля 2017 г. руководствуются Глобальными практическими рекомендациями Всемирной Гастроэнтерологической Организации) [2].

В 3-й группе забор материала осуществлялся через 7 дней после отмены антибиотиков. Показанием к назначению антибиотикотерапии было клиническое состояние ребенка, признаки воспаления в клиническом анализе крови, заключение лабораторных обследований и выявление многокамерных кист при ультразвуковых исследованиях головного мозга и т.д.

Согласно приказу Минздрава России, новорожденным недоношенным детям с дисбиотическими расстройствами кишечника, симптомом срыгивания, неблагоприятным изменением в клиническом анализе крови, отрицательной весовой кривой и т.д. назначают курс группы полусинтетических пенициллинов и с целью усиления антибактериальной терапии 30% новорожденным — аминогликозиды, 20% — макролиды и 10%

— гликопептид и карбопенем (Приказ Министерства здравоохранения Удмуртской Республики от 23.12.2011 г. № 757 «О порядке оказания медицинской помощи беременным женщинам при преждевременных родах и недоношенным новорожденным детям») [9].

Уровень лизоцима ротовой жидкости определяли: у 18 доношенных новорожденных без приема антибиотиков и пробиотиков; 22 доношенных детей, которые получали пробиотики, и 14 доношенных детей после приема антибиотиков. Такую же процедуру осуществляли у 14 недоношенных новорожденных, которые не получали антибиотики и пробиотики, у 26 детей с назначением пробиотиков и у 34 недоношенных детей после антибактериальной терапии.

Сбор ротовой жидкости проводили по стандартизированному алгоритму [10]. Ротовая жидкость собиралась натошак в стерильную пробирку, после ополаскивания ротовой полости физиологическим раствором. Полученная ротовая жидкость разводилась дистиллированной водой в 2 раза и центрифугировалась в течение 10 мин при 3000 об/мин, после чего замораживалась при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранилась при этой температуре не более 24 ч.

Определение активности лизоцима проводили бактериолитическим методом Горина, в модификации Левицкого и Жигалиной [7]. В основу метода положена способность лизоцима лизировать ряд бактерий. В кювету спектрофотометра, снабженного термостабилизирующим устройством для поддержания температуры $+30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, вносили 3,0 мл субстрата, подогревали до $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 5–6 минут, прибавляли 0,1 мл слюны, перемешивали аккуратно прямо в кювете и включали секундомер. Записывали показания прибора при 570 нм на 1-, 3- и 6-й минутах инкубации.

Работа проводилась с разрешения этического комитета ФГБОУ ВО Тверского государственного медицинского университета (ГМУ) Минздрава России. Материал собирали в стерильные пробирки, в течение 2 часов доставляли в бактериологическую лабораторию Тверского ГМУ. Для выделения факультативно анаэробных и аэробных бактерий были использованы следующие питательные среды: хромогенный селективный агар для уропатогенных кишечных бактерий, маннит-солевой агар (M118) — для стафилококков, агар Баэрда — Паркера — для выявления лецитиназной активности, HiCrome Bacillus Agar — для обнаружения и идентификации бацилл, МРС лактоагар — для лактобацилл, HiCrome Enterococcus faecium Agar — для энтерококков, желчно-эскулиновый агар — для бактероидов, шоколадный агар — для нейссерий, хромогенные среды — для выявления дрожжевых грибов рода *Candida*, HiCrom Listeria Agar —

для листерий, Mitis Salivarius Agar — для стрептококков (HiMedia). Для культивирования анаэробов применяли бифидоагар и кровяной агар Шедлера.

Идентификация выделенных микроорганизмов проводилась по культуральным, морфологическим, тинкториальным свойствам. Биохимическая активность определялась с использованием АРІ систем (bioMérieux). Количество выделенных микроорганизмов выражали в lg КОЕ/мл или КОЕ/г.

Статистическую обработку материала проводили с использованием программы «STATISTICA» (StatSoftRussia). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Фишера, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В ротовой жидкости у недоношенных новорожденных без назначения пробиотиков и без антибиотиков (рис. 1) выделялись в 79% *Staphylococcus epidermidis*, в 63% — *Peptostreptococcus* spp. и *Micrococcus* spp., в 53% — *Peptococcus* spp., в 42% — *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus aureus*, в 32% — *Stomatococcus* spp., в 21% — *Enterococcus* spp. и *Bacteroides* spp., в 16% — *Bifidobacterium* spp. и *Bacillus subtilis* и в 3–5% — *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium* spp., *Enterococcus faecalis*, *Veillonella* spp., *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus megaterium* и другие бактерии семейства *Enterobacteriaceae*.



Рис. 1. Частота встречаемости микроорганизмов ротовой жидкости у недоношенных новорожденных без и после приема антибиотиков и пробиотиков. Примечание: * — достоверно значимые значения для микроорганизмов при $p < 0,05$

Количество микроорганизмов составляло от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл у *Staphylococcus epidermidis*, *Peptostreptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Stomatococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Veillonella* spp., *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* и других бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

В ротовой жидкости у недоношенных новорожденных на фоне приема пробиотиков и без антибиотиков вы-

делялись: *Peptostreptococcus* spp. — 69%, *Staphylococcus epidermidis* — 61%, *Streptococcus* spp., *Stomatococcus* spp. и *Micrococcus* spp. — по 38%, *Peptococcus* spp. и *Enterococcus* spp. — по 23%, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Clostridium* spp. и *Lactobacillus* spp. — по 15%, *Streptococcus pyogenes*, *Veillonella* spp. и *Bacillus* spp. — по 7%.

Количество микроорганизмов составляло от 6 lg КОЕ/мл до 7 lg КОЕ/мл у *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Peptococcus* spp. *Lactobacillus* spp.; от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл — у *Peptostreptococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Stomatococcus* spp.,

Micrococcus spp., *Streptococcus salivarius*, *Clostridium* spp., *Veillonella* spp., *Bacillus* spp. и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Streptococcus pyogenes* и *Enterococcus* spp.

В ротовой жидкости у недоношенных новорожденных без пробиотиков и после курса антибиотиков выделялись *Staphylococcus epidermidis* в 93%, *Streptococcus* spp. — в 57%, *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. — по 39%, *Stomatococcus* spp. — в 36%, *Clostridium* spp. — в 32%, *Peptococcus* spp. и *Veillonella* spp. — по 25%, *Peptostreptococcus* spp. — в 21%, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus salivarius* — по 18%, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumonia* и *Micrococcus* spp. — по 14% и в 3–7% — у *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria* spp., *Bifidobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* и *Yersinia* spp.

Количество микроорганизмов составляло от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл у *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp.,

Stomatococcus spp., *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Candida albicans*, *Klebsiella pneumonia*, *Micrococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria* spp., *Bifidobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Yersinia* spp. и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*.

В содержимом желудка у недоношенных новорожденных без пробиотиков и без приема антибиотиков (рис. 2) выделялись: *Peptostreptococcus* spp. и *Micrococcus* spp. — по 45%, *Staphylococcus epidermidis* — 36%, *Peptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* и *Stomatococcus* spp. — по 27%, *Bifidobacterium* spp. — по 16%, *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., и *Lactobacillus* spp. — по 18% и в 9–1% — *Clostridium* spp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Candida* spp., *Bifidobacterium* spp. и *Bacillus cereus*.

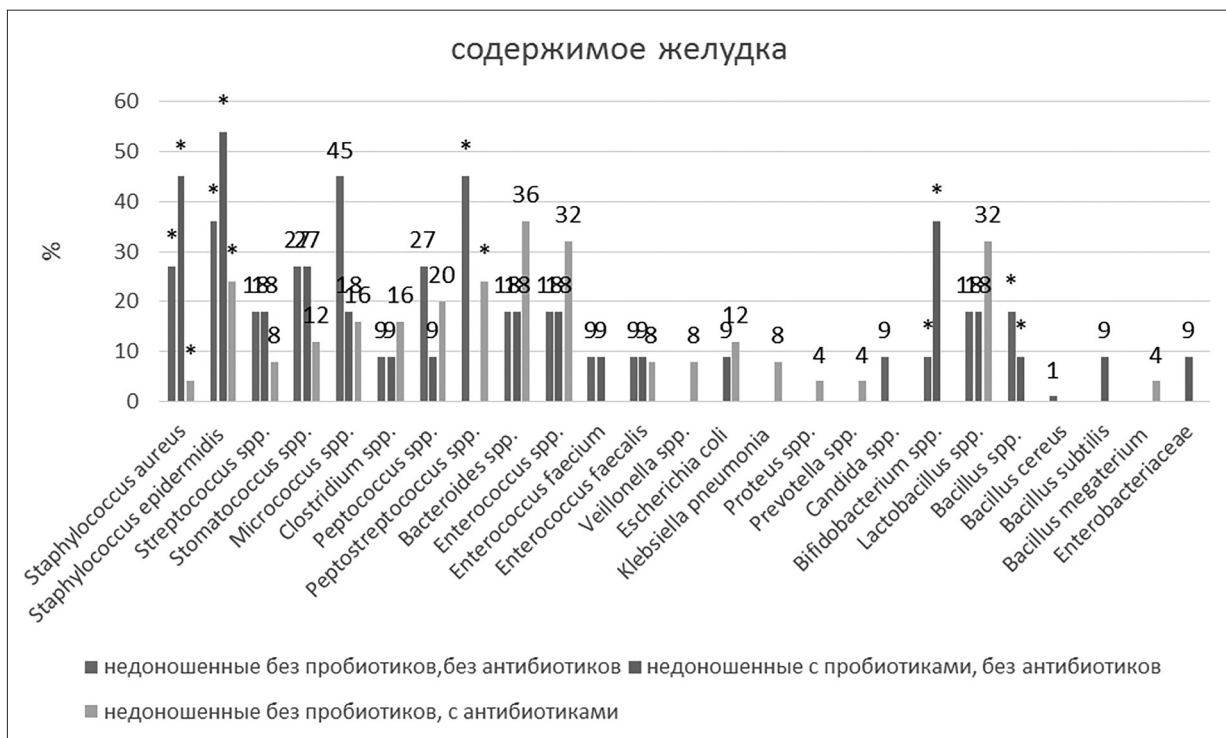


Рис. 2. Частота встречаемости микроорганизмов содержимого желудка у недоношенных новорожденных без и после приема антибиотиков и пробиотиков. Примечание: * — достоверно значимые значения для микроорганизмов при $p < 0,05$

Количество микробиоты данного биотопа колебался от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл у *Peptostreptococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Peptococcus* spp., *Stomatococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Micrococcus*

spp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Candida* spp., *Bifidobacterium* spp. и *Bacillus cereus*.

В содержимом желудка у недоношенных новорожденных на фоне приема пробиотиков и без антибиотиков выделялись в 54% *Staphylococcus epidermidis*, в 45% — *Staphylococcus aureus*, в 27% — *Stomatococcus* spp., в 36% — *Bifidobacterium* spp., в 18% — *Streptococcus*

сpp., *Micrococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp., в 9% — *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis* и другие бактерии семейства *Enterobacteriaceae*.

Количество микроорганизмов составляло от 6 lg КОЕ/мл до 7 lg КОЕ/мл у *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp.; от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bifidobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Peptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Stomatococcus* spp., *Enterococcus* spp. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*.

В содержимом желудка у недоношенных новорожденных без пробиотиков и после курса антибиотиков выделялись *Bacteroides* spp. в 36%, *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. — по 32%, *Staphylococcus epidermidis* и *Peptostreptococcus* spp. — по 24%, *Peptococcus* spp. — в 20%, *Micrococcus* spp. и *Clostridium* spp. — по 16%, *Stomatococcus* spp. и *Escherichia coli* — по 12% и в 8–4%

— *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Veillonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Prevotella* spp., *Bacillus megaterium*.

Количество микробиоты данного биотопа колебался от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл у *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Stomatococcus* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Prevotella* spp. и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Proteus* spp. и *Bacillus megaterium*.

У недоношенных детей количество лизоцима ротовой жидкости (рис. 3) без пробиотиков и без антибиотиков было равно $183,92 \pm 33,6$ мг/мл, а у доношенных — $132,89 \pm 8,17$ мг/мл. При применении пробиотиков количество лизоцима ротовой жидкости у недоношенных новорожденных составляло $64,23 \pm 36,2$ мг/мл, у доношенных — $157,03 \pm 6,31$ мг/мл. При назначении антибиотиков у недоношенных новорожденных уровень лизоцима ротовой жидкости составлял $92,84 \pm 31,48$ мг/мл, доношенных — $123,08 \pm 4,92$ мг/мл.

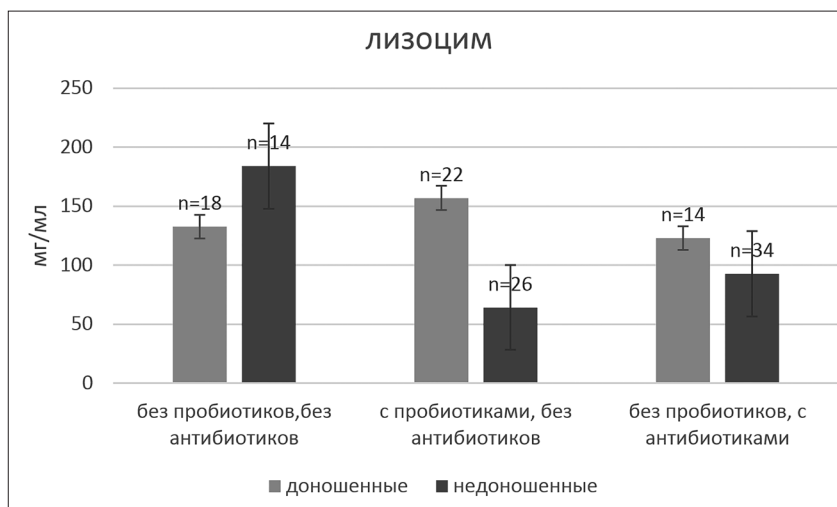


Рис. 3. Показатели лизоцима ротовой жидкости без/с антибиотиками и без/с пробиотиками у доношенных и недоношенных новорожденных

Заклучение

В ротовой жидкости (см. рис. 1) у недоношенных детей, получавших антибиотики, выделение лактобацилл возрастало в 7,8 раза (39%) и в 3 раза (15%) при применении пробиотиков. При применении антибиотиков увеличивается частота выделения *Clostridium* spp. в 6 раз, *Veillonella* spp. — в 5 раз, *Candida albicans* — в 3 раза, *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp. — в 2 раза. На фоне применения антибиотиков золотистый стафилококк

выделялся примерно в 2 раза реже, а после курса пробиотиков — в 2,5 раза реже. Антибиотики сказывались на уменьшении выделения микрококков в 4,5 раза, пептострептококков — в 3 раза, пептококков — в 2 раза. Пробиотики не оказывали отрицательного влияния на стрептококки, стоматококки, пептострептококки, энтерококки.

Только после курса антибиотиков в 3–14% выделялись *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria* spp., *Bacillus cereus*, *Yersinia* spp. в количестве 3,5–5,5 lg КОЕ/мл.

В содержимом желудка (см. рис. 2) после курса антибиотиков в 6,5 раза реже выделялись *Staphylococcus aureus*, в 2,8 раза — *Micrococcus* spp., в 2,2 раза — *Streptococcus* spp., в 1,8 раза — *Peptostreptococcus* spp., в 1,5 раза — *Staphylococcus epidermidis*. Только после курса антибиотиков в 4–8% появлялись *Veillonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Prevotella* spp. и *Bacillus megaterium* в количестве 3,4–5,5 lg КОЕ/мл.

Чаще в 2–1,7 раза по сравнению с контрольной группой изолировались *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp. и *Lactobacillus* spp.

У недоношенных новорожденных на фоне приема пробиотиков по сравнению с контрольной группой в 4 раза чаще изолировались *Bifidobacterium* spp., однако в 1,6–1,5 раза чаще выделялись и *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Реже в 3 раза — *Peptococcus* spp., в 2,5 раза — *Micrococcus* spp., в 2 раза — *Bacillus* spp. Только на фоне пробиотиков появлялись *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и другие бактерии семейства *Enterobacteriaceae* в количестве 3,3–4,5 lg КОЕ/мл.

На основании выполненной работы можно сделать такие выводы:

1. При применении антибиотиков выделение лактобацилл в ротовой жидкости недоношенных новорожденных детей в 7,8 раза ($p=0,04$) выше, а пробиотиков — в 3 раза выше, чем у доношенных детей.

2. Антибиотики так же, как и пробиотики, в 2–4 раза ($p<0,196$) снижали частоту выделения условно-патогенных золотистых стафилококков, пептококков, микрококков. Угнеталось выделение бифидобактерий.

3. В содержимом желудка на фоне применения антибиотиков в 2 раза ($p=0,474$) чаще выделялись лактобациллы, в 12% появлялись кишечные палочки и не изолировались бифидобактерии. *Staphylococcus aureus* выделялся только в 4% по сравнению с контрольной группой — 27%. В 2 раза реже ($p<0,356$) изолировались *Staphylococcus epidermidis*, стоматококки, стрептококки, микрококки, пептококки, пептострептококки.

4. При применении пробиотиков в 4 раза ($p<0,001$) увеличивалась выделяемость бифидобактерий, в 2 раза уменьшалась высеваемость энтеробактерий, бацилл, частота выделения лактобацилл по сравнению с контрольной группой не изменялась. Однако в 1,6 раза чаще выделялись золотистые и эпидермальные стафилококки.

5. Применение пробиотиков, в отличие от антибиотиков, улучшает нормобиоценоз и так же, как и антибиотики, в некоторых случаях более эффективно угнетает патогенную и условно-патогенную микрофлору.

6. Без применения антибиотиков и пробиотиков уровень лизоцима ротовой жидкости у недоношенных в 1,4 раза выше. При применении как антибиотиков, так и пробиотиков уровень лизоцима у недоношенных регистрировался в 1,3–2,5 раза меньше, чем у доношенных детей.

Литература

1. Беляева И.А., Бомбардиров Е.П. Онтогенез и дизонтогенез микробиоты кишечника у детей раннего возраста: триггерный механизм нарушений детского здоровья // Вопросы современной педиатрии. — 2017. — Т. 16. — № 1. — С. 29–38.
2. Глобальные практические рекомендации Всемирной Гастроэнтерологической Организации от февраля 2017 г. — URL: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-russian-2017.pdf>.
3. Захарова И.Н., Ардатская М.Д., Сугян Н.Г. Влияние мультиштаммового пробиотика на метаболическую активность кишечной микрофлоры у детей грудного возраста с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта: результаты плацебо-контролируемого исследования // Вопросы современной педиатрии. — 2016. — Т. 15. — № 1. — С. 68–73.
4. Захарова И.Н., Кафарская Л.Н. Микробиота кишечника у детей: новые представления // Педиатрия. — 2012. — № 5. — С. 52–60.
5. Ковтун А.В., Яковенко А.В., Иванов А.Н., Прянишников А.С., Васильев И.В., Агафонова Н.А., Яковенко Э.П. Использование пробиотиков в клинической практике // Журнал «Лечащий врач». — 2011. — № 10. — С. 1–10. — URL: <https://www.lvrach.ru/2011/10/15435284> (дата обращения: 20.06.2018).
6. Корниенко Е.А., Кубалова С.С. Роль лактазной недостаточности и кишечной микрофлоры в развитии функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта у детей первого полугодия жизни // Вопросы современной педиатрии. — 2013. — Т. 12. — № 4. — С. 159–165.
7. Левицкий А.П. Лизоцим вместо антибиотиков. — Одесса, 2005. — 90 с.
8. Приворотский В.Ф., Бельмер С.В., Чернова Т.М. Инновации в коррекции кишечного микробиоценоза у детей — есть ли преимущества у мультипробиотиков? // Эффективная фармакотерапия. — 2016. — № 7. — С. 24–32.
9. Приказ МЗУР от 23.12.2011 г. № 757. О порядке оказания медицинской помощи беременным женщинам при преждевременных родах и недоношенным новорожденным детям. <https://buzurdgkp2mzur.ru/images/stories/prikaz757.pdf>.
10. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: метод. рекомендации / А. П. Левицкий и др. — Киев, 2007. — 24 с.
11. Adamsson I., Nord C.E., Lundquist P., Sjöstedt S., Edlund C. Comparative effects of omeprazole, amoxicillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole

- on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2009. — Vol. 44(5). — P. 629–640.
12. *Arbolea S., Binetti A., Salazar N., Fernández N., Solís G., Hernández-Barranco A., et al.* Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2012. — Vol. 79(3). — P. 763–772.
 13. *Bajorek S., Parker L., Li N., Winglee K., Weaver M., Johnson J., Sioda M., Gauthier J., Lemas D.J., Jobin Ch., Lorca G., Neu J. & Fodor A.A.* Initial microbial community of the neonatal stomach immediately after birth // *Gut Microbes.* — 2019. — Vol. 10. — No. 3. — P. 289–297.
 14. *Blaut M., Clavel T.* Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease // *J. Nutr.* — 2007. — Vol. 137(3 Suppl 2). — 751S–755S.
 15. *Bäckhed F.* 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: the normal gut microbiota in health and disease // *Clin. Exp. Immunol.* — 2010. — Vol. 160. — P. 80–84.
 16. *Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V.* Intestinal microflora in early infancy: composition and development // *Acta Paediatr. Suppl.* — 2013. — Vol. 91(441). — P. 48–55.
 17. *Gómez M., Moles L., Melgar A., Ureta N., Bustos G., Fernández L., et al.* Early gut colonization of preterm infants: effect of enteral feeding tubes // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* — 2016. — Vol. 62(6). — P. 893–900.
 18. *Hurrell E., Kucerova E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Hilton A., Armstrong R., et al.* Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae // *BMC Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 9. — P. 146. doi:10.1186/1471-2334-9-146.
 19. *Moles L., Gómez M., Jiménez E., Bustos G., de Andrés J., Melgar A., Escuder D., Fernández L., del Campo R. and Rodríguez J.M.* Bacterial diversity of the gastric content of preterm infants during their first month of life at the hospital // *Front. Nutr.* — 2017. — Vol. 4. — P. 12. doi: 10.3389/fnut.2017.00012.
 20. *Mshvildadze M., Neu J., Shuster J., Theriaque D., Li N., Mai V.* Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques // *J. Pediatr.* — 2010. — Vol. 156. — P. 20–25.
 21. *Murgas T.R., Neu J.* The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate // *J. Perinatol.* — 2011. — Vol. 31(Suppl. 1). — S29–S34. doi:10.1038/jp.2010.172.
 22. *Nye C.* Transitioning premature infants from gavage to breast // *Neonatal Netw.* — 2008. — Vol. 27(1). — P. 7–13.
 23. *Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F.F., Snijders B., Kummeling I., et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy // *Pediatrics.* — 2006. — Vol. 118. — P. 511–521.
 24. *Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes // *Nature.* — 2012. — Vol. 490. — P. 55–60.
 25. *Salter S.J., Cox M.J., Turek E.M., Calus S.T., Cookson W.O., Moffatt M.F., Turner P., Parkhill J., Loman N.J., Walker A.W.* Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses // *BMC Biol.* — 2014. — Vol. 12. — P. 87. doi:10.1186/s12915-014-0087-z.
 26. *Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins // *Nature.* — 2009. — Vol. 457(7228). — P. 480–484.
 27. *Woodford N., Turton J.F., Livermore D.M.* Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2011. — Vol. 35. — P. 736–755.

References

1. Belyayeva IA, Bombardirova YeP. Ontogenez i dizontogenez mikrobioty kishhechnika u detey rannego vozrasta: triggernyy mekhanizm narusheniy detskogo zdorov'ya. *Voprosy sovremennoy pediatrii* 2017; 16(1):29–38 (in Russian).
2. Global'nyye prakticheskiye rekomendatsii Vsemirnogo Gastroenterologicheskoy Organizatsii ot fevralya 2017 g. URL: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-russian-2017.pdf> (in Russian).
3. Zakharova IN, Ardatskaya MD, Sugyan NG. Vliyaniye mul'tishtammovogo probiotika na metabolicheskuyu aktivnost' kishhechnoy mikroflory u detey grudnogo vozrasta s funktsional'nymi narusheniyami zheludochno-kishhechnogo trakta: rezul'taty platsebokontroliruyemogo issledovaniya. *Voprosy sovremennoy pediatrii* 2016; 15(1):68–73 (in Russian).
4. Zakharova IN, Kafarskaya LN. Mikrobiota kishhechnika u detey: novyye predstavleniya. *Pediatrics* 2012; 5:52–60 (in Russian).
5. Kovtun AV, Yakovenko AV, Ivanov AN, Pryanishnikova AS, Vasil'yev IV, Agafonova NA, Yakovenko EP. Ispol'zovaniye probiotikov v klinicheskoy praktike. *Zhurnal «Lechashchiy vrach»* 2011; 10:1–10. URL: <https://www.lvrach.ru/2011/10/15435284> (data obrashcheniya: 20.06.2018) (in Russian).
6. Korniyenko YeA, Kubalova SS. Rol' laktaznoy nedostatochnosti i kishhechnoy mikroflory v razvitii funktsional'nykh rasstroystv zheludochno-kishhechnogo trakta u detey pervogo polugodiya zhizni. *Voprosy sovremennoy pediatrii* 2013; 12(4):159–165 (in Russian).
7. Levitskiy AP. *Lizotsim vmesto antibiotikov.* Odessa, 2005: 90 (in Russian).
8. Privorotskiy VF, Bel'mer SV, Chernova TM. Innovatsii v korrektsii kishhechnogo mikrobiotsenoza u detey — yest' li preimushchestva u mul'tiprobiotikov? *Effektivnaya farmakoterapiya* 2016; 7:24–32 (in Russian).
9. Prikaz MZ UR ot 23.12.2011 g. № 757. O poryadke okazaniya meditsinskoy pomoshchi beremennym zhenshchinam pri prezhdevremennykh rodakh i nedonoshennym novorozhden-

- nym detyam. <https://buzurdgkp2mzur.ru/images/stories/prikaz757.pdf> (in Russian).
10. Fermentativnyy metod opredeleniya disbioza polosti rta dlya skringa pro- i prebiotikov: metod. rekomendatsii. AP Levitskiy i dr. Kiyev, 2007: 24 (in Russian).
 11. Adamsson I, Nord CE, Lundquist P, Sjöstedt S, Edlund C. Comparative effects of omeprazole, amoxicillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2009; 44(5):629–640.
 12. Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, Solís G, Hernández-Barranco A, et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; 79(3):763–772.
 13. Bajorek S, Parker L, Li N, Winglee K, Weaver M, Johnson J, Sioda M, Gauthier J, Lemas DJ, Jobin Ch, Lorca G, Neu J & Fodor AA. Initial microbial community of the neonatal stomach immediately after birth. *Gut Microbes* 2019; 10(3):289–297.
 14. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* 2007; 137(3 Suppl 2):751S–755S.
 15. Bäckhed F. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: the normal gut microbiota in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 160:80–84.
 16. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2013; 91(441):48–55.
 17. Gómez M, Moles L, Melgar A, Ureta N, Bustos G, Fernández L, et al. Early gut colonization of preterm infants: effect of enteral feeding tubes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016; 62(6):893–900.
 18. Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Hilton A, Armstrong R, et al. Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae. *BMC Infect Dis* 2009; 9:146. doi:10.1186/1471-2334-9-146.
 19. Moles L, Gómez M, Jiménez E, Bustos G, de Andrés J, Melgar A, Escuder D, Fernández L, del Campo R and Rodríguez JM. Bacterial diversity of the gastric content of preterm infants during their first month of life at the hospital. *Front Nutr* 2017; 4:12. doi: 10.3389/fnut.2017.00012.
 20. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, Mai V. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr* 2010; 156:20–25.
 21. Murgas TR, Neu J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J Perinatol* 2011; 31(Suppl. 1):S29–S34. doi:10.1038/jp.2010.172.
 22. Nye C. Transitioning premature infants from gavage to breast. *Neonatal Netw* 2008; 27(1):7–13.
 23. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118:511–521.
 24. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:55–60.
 25. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ, Walker AW. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 2014; 12:87. doi:10.1186/s12915-014-0087-z.
 26. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457(7228):480–484.
 27. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35:736–755.

FORMATION OF MICROBIOTA AND LOCAL HUMORAL IMMUNITY OF THE ORAL AND STOMACH CAVITY IN PREMATURE NEWBORNS WITHOUT AND AFTER TAKING ANTIBIOTICS AND PROBIOTICS

O.A. PETROVA, V.M. CHERVINETS, Yu.V. CHERVINETS

Tver State Medical University, Tver

The aim of the work was to monitor the composition of the oral fluid microflora, stomach contents in premature newborns without and after taking antibiotics and probiotics, as well as to determine the amount of oral fluid lysozyme in full-term and premature newborns. The study included 30 preterm infants who did not receive antibiotics and probiotics, 30 preterm infants after taking probiotics and 30 after prescribing antibiotics. The bacteriological study was carried out using optimal nutrient media (HiMedia) and identification systems (bioMérieux Vitek, Inc). It was found that in the oral fluid of premature infants who received antibiotics, the release of lactobacilli increased 7.8 times and 3 times when using probiotics. After a course of antibiotics, the frequency of excretion of *Clostridium spp.* 6 times, *Veillonella spp.* — 5 times, *Candida albicans* — 3 times, *Enterococcus spp.*, *Bacteroides spp.* — 2 times. Against the background of the use of antibiotics and probiotics, *Staphylococcus aureus* was isolated 2–2.5 times less frequently. Also given are data on the

microflora of the stomach, obtained by a similar method. Studied the level of lysozyme in the oral fluid in premature infants (it decreases after taking antibiotics and probiotics by 2–3 times).

Keywords: microbiota, newborns, antibiotics, probiotics, lysozyme.

Address:

Petrova O.A.

postgraduate student of the Department of Microbiology and Virology with a course in immunology; Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the Tver State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tver
E-mail: ollgap@mail.ru

Для цитирования:

Петрова О.А., Червинец В.М., Червинец Ю.В. Формирование микробиоты и местного гуморального иммунитета полости рта и желудка у недоношенных новорожденных детей без и после приема антибиотиков и пробиотиков. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):55–63.

For citation:

Petrova O.A., Chervinets V.M., Chervinets Yu.V. Formation of microbiota and local humoral immunity of the oral and stomach cavity in premature newborns without and after taking antibiotics and probiotics. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):55–63 (in Russian).

ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФИТОМЕЛАНИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ КИСЛОТ

И.А. ФОМЕНКО*, Л.А. ИВАНОВА, Л.А. ЧУРМАСОВА, И.А. ДЕГТЯРЕВ

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», Москва

В работе рассмотрена модификация технологии получения водорастворимой субстанции, содержащей фитомеланины из подсолнечной лузги. Цель работы — исследование возможности применения ортофосфорной кислоты при выделении фитомеланинов. Показано, что при использовании этой кислоты удается повысить выход фитомеланинов на 40%, а их адсорбционную способность и общую антиоксидантную активность — на 10 и 12%, соответственно. Описана модифицированная технология получения водорастворимых фитомеланинов. Полученная таким способом субстанция, содержащая фитомеланины, имеет адсорбционную способность на уровне 91,63 мг метиленового синего/г субстанции; общую антиоксидантную активность на модельной тест-системе — 32,5%.

Ключевые слова: лузга подсолнечника, меланины, фитомеланины, экстракция.

Введение

Проблема эффективного использования растительных отходов будет актуальна еще долгие годы. В США производство сои занимает лидирующую позицию, в то время как в Европе на первом месте по сбору урожая стоит рапс, а затем подсолнечник [20]. В рамках мирового масштаба на производство сои отводится половина всех посевных площадей, а на подсолнечник и кунжут — 20% [19]. Однако переработка масличных культур сопряжена с образованием достаточно большого количества отходов. Так, большое количество отходов образуется на масложировых предприятиях, среди которых в России насчитывается более 1 млн т в год подсолнечной лузги [5]. В настоящий момент существует несколько вариантов использования лузги: изготовление топливных пеллетов, получение кормовых добавок [9, 15].

Растительные отходы — это источник ценных компонентов. Среди компонентов, встречающихся в подсолнечной лузге, можно выделить фосфолипиды, глицериды, большое количество моносахаридов и аннунулиды, оказывающие аллелопатическое действие [3].

Также важным компонентом является меланин. Он содержится во многих растительных отходах, в частности в подсолнечной лузге [12]. Меланины вступают в окислительно-восстановительные реакции. Они являются антиоксидантами, выполняют функцию акцепторов свободных электронов, а также отмечается их способность поглощать УФ-излучение [2]. Изучены сорбционные характеристики меланинов, выделенных из лузги подсолнечника. К тому же меланины — это натуральный пигмент, применяемый в качестве красителей.

К природным источникам меланинов относят грибы-базидиомицеты, микроорганизмы, растения и животные. Выделять меланины из таких источников, как шерсть, чернила и др., достаточно сложно [17]. В настоящее время меланины получают химическим способом, однако их свойства отличаются от природных [18]. Перспективным является способ получения меланинов с использованием микроорганизмов [14]. Показана возможность экстракции меланинов из отходов растительного сырья — лузги подсолнечника — при помощи растворов щелочей в различных концентрациях [13].

Меланины обладают широким спектром применения. Их используют при производстве косметических средств. Меланины можно рассматривать в качестве замены неорганических полупроводников благодаря их электропроводным свойствам [10]. Такой материал является биосовместимым, а также не загрязняет окружающую среду. Меланинам присуща и хелатирующая способность [11], что позволяет применять их для биоремедиации почв. Фитомеланины входят в состав кремов, замедляющих преждевременное старение кожи.

© 2021 г. Фоменко И.А., Иванова Л.А., Чурмасова Л.А., Дегтярев И.А.

* Автор для переписки:

Фоменко Иван Андреевич

аспирант, старший преподаватель кафедры «Биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств

E-mail: iv.fomenko@mail.ru

В качестве пищевых добавок фитомеланины могут быть использованы для окрашивания продуктов и удлинения их срока хранения. Попадая в организм, они оказывают благоприятное воздействие на состояние здоровья человека. Отмечается их участие в регуляции вегетативных функций: сердечно-сосудистой системы, дыхания [1]. Кроме того, они обладают иммуностимулирующими свойствами, способствуют ускоренному синтезу интерферонов [16]. В одной из работ была показана эффективность использования меланинов в качестве пищевой добавки, входящей в состав мармелада: констатируются высокая антиоксидантная активность и увеличение срока хранения продукции на 5% [4].

Таким образом, имеется множество данных, указывающих на достоинства меланинов. Они выполняют роль протекторов, способны сорбировать токсичные компоненты, служат натуральными красителями и радиопротекторами. Введение фитомеланинов в рецептуры пищевых продуктов позволит конструировать функциональные продукты питания, оказывающие лечебно-профилактическое действие.

Материалы и методы

Исходным сырьем для получения водорастворимых фитомеланинов является лузга подсолнечника, полученная на масличном производстве ООО «Бунге СНГ». Содержание фитомеланинов может достигать 2% от массы лузги.

Технологическая схема получения водорастворимых фитомеланинов включает в себя измельчение лузги подсолнечника на мельницах с различной степенью измельчения продукта; суспендирование лузги подсолнечника при гидромодуле 1:9,5; 1:9; 1:8,5, в качестве дисперсной среды используются растворы едкого натра различной концентрации; экстракция при температуре 120–125 °С в течение 1 ч; отделение нерастворимых частиц от экстрагента, содержащего фитомеланины; суспендирование осадка при гидромодуле 1:8,5 в растворе едкого натра; повторная экстракция при аналогичных условиях; объединение экстрактов; установление в экстрактах рН 1,0–2,0 с помощью соляной или ортофосфорной кислоты; центрифугирование полученного осадка фитомеланинов, ресуспендирование его в очищенной воде в соотношении 2:1; установление рН 7,0 и сушка полученных фитомеланинов.

Методы качественного анализа фитомеланинов

Обесцвечивание раствора фитомеланинов при добавлении концентрированного раствора пероксида водорода с образованием пузырьков газа.

При добавлении к раствору фитомеланинов раствора перманганата калия наблюдается образование раствора с зеленой окраской, с последующим выпадением осадка и обесцвечиванием раствора.

Образование хлопьевидного осадка при добавлении к раствору фитомеланинов раствора хлористого железа (III) и его растворение в избытке реактива.

Адсорбционная способность

Адсорбционную способность полученной фракции фитомеланинов определяли спектрофотометрическим способом. Результат определения выражают в миллиграммах метиленового синего в пересчете на 1 г субстанции [2].

Общая антиоксидантная активность

Определение общей антиоксидантной активности осуществляли с использованием модельной системы, представляющей собой суспензию липопротеидов желтка куриных яиц, помещенную в среду для проведения реакции перекисного окисления липидов [2].

Результаты и обсуждение

Известен ряд способов получения меланинов из различного растительного сырья, в том числе из лузги подсолнечника [6, 8]. Во всех представленных способах выделение меланинов из экстрактов основано на их способности выпадать в осадок при низких (1,0–2,0) значениях рН, в качестве подкислителя используют раствор соляной кислоты. Подобная обработка позволяет отделить фитомеланины от низкомолекулярных и растворимых в кислоте высокомолекулярных соединений. В результате подобной обработки получается продукт с пониженным содержанием балластных веществ, что, безусловно, сказывается на улучшении качества получаемых фитомеланинов.

Нативную лузгу подсолнечника измельчали на роторной ударной мельнице Retsch SR 200 до размера частиц 20–100 мкм. Измельченную лузгу суспендировали при гидромодуле 1:8,5, в качестве дисперсной среды использовали раствор едкого натра с концентрацией основного вещества от 0,5 до 10%. Экстракцию проводили дважды, после чего объединенные экстракты подкисляли соляной и ортофосфорной кислотами до рН 1,0±0,1. Полученный осадок высушивали и определяли его выход относительно массы измельченной лузги, адсорбционную и общую антиоксидантную активность. Полученные данные представлены в таблице 1.

По данным таблицы 1, видно, что при использовании ортофосфорной кислоты в качестве подкислителя

увеличивается выход осадка, содержащего фитомеланины. Наибольшая разница наблюдается при использовании 4 и 6% растворов едкого натра. Для всех полученных образцов был подтвержден меланоидный характер с помощью качественных реакций, а также определена адсорбционная способность и общая антиоксидантная активность (табл. 2).

Таблица 1

Сравнение выхода фитомеланинов при использовании соляной и ортофосфорной кислот в качестве осадителя

Концентрация NaOH, %	Выход осадка по отношению к массе лузги при осаждении соляной кислотой, %	Выход осадка по отношению к массе лузги при осаждении ортофосфорной кислотой, %
0,5	0,44	0,66
1,0	2,12	3,19
2,0	9,02	13,22
4,0	28,51	39,71
6,0	32,81	41,16
8,0	36,17	42,11
10,0	42,88	45,94

Таблица 2

Адсорбционная способность и общая антиоксидантная активность полученных образцов фитомеланинов

Концентрация NaOH, %	Адсорбционная способность, мг метиленового синего/г субстанции		Общая антиоксидантная активность, %	
	Осадитель соляная кислота	Осадитель ортофосфорная кислота	Осадитель соляная кислота	Осадитель ортофосфорная кислота
0,5	71,35	78,92	—	—
1,0	75,61	84,18	—	—
2,0	77,25	88,17	29,1	32,5
4,0	82,71	91,63	28,2	31,6
6,0	75,65	80,81	26,4	30,1
8,0	53,23	58,77	18,5	20,8
10,0	48,38	52,17	10,9	13,7

При использовании в качестве осадителя ортофосфорной кислоты наблюдается повышение адсорбционной способности и общей антиоксидантной активности в получаемой субстанции. Данное повышение заметно при сравнении с аналогичными работами [2, 7]. Адсорбционная способность связана с наличием в получаемой субстанции лигнина, содержание которого в нативной лузге достигает 20–25% от массы.

Наибольшая активность меланинов наблюдается при использовании в качестве экстрагента раствора

едкого натра с концентрацией основного вещества 1, 2 и 4%; использование более концентрированных растворов экстрагента способствует экстракции большего количества балластных веществ, отличных от природы фитомеланинов, в связи с чем наблюдается понижение адсорбционной способности и общей антиоксидантной активности в получаемой субстанции.

Заключение

Проведенные исследования показали целесообразность использования ортофосфорной кислоты как альтернативы соляной кислоте. При ее использовании удается увеличить выход фитомеланинов на 40%, повысить адсорбционную способность (на 10%) и общую антиоксидантную активность (на 12%).

Литература

1. Иванов А.А., Андрианова И.Е., Мальцев В.Н., Абросимова, А.Н., Бульжина Т.М., Ворожцова С.В., Северюхин Ю.С., Ставракова Н.М. Фармакологические свойства фитомеланина // Медицина экстремальных ситуаций. — 2014. — № 4(50). — С. 66–72.
2. Иванова Л.А., Фоменко И.А., Сергеева Д.А., и др. Разработка технологии получения фитомеланинов из отходов масличного производства // Health, Food & Biotechnology. — 2019. — № 2. <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i2.s245>.
3. Ковехова А.В., Земнухова Л.А., Рыбин В.Г. Полифункциональные материалы из плодовых оболочек подсолнечника / XI Международная научно-техническая конференция «Современные проблемы экологии»: Тез. докл. — 2014. — С. 48.
4. Кузнецова О.Ю. Разработка кондитерских мармеладных изделий функционального назначения // Вестник Казанского технологического университета. — 2013. — Т. 16. — № 20. — С. 206–210.
5. Мустафаев С.К., Смычагин Е.О. Разработка комплексной технологии переработки отходов масложирового производства // Электронный сетевой политематический журнал «Научные труды КубГТУ». — 2019. — № 3. — С. 883–895.
6. Пат. РФ 2215761, С09В 61/00, 2003. Способ получения пигмента-красителя из растительного сырья. Огарков Б. Н., Самусенок Л. В. Опубликовано 10.11.2003.
7. Пат. РФ 2613294, А61К 36/28, В01Д 11/02. Способ получения меланина из лузги подсолнечника. Грачева Н.В., Желтобрюхов В.Ф., Гопованчиков А.Б. Опубликовано 15.03.2017.
8. Сушинская Н.В. Получение и физико-химические свойства меланинов из базидиомицетов / Труды Белорусского

- государственного технологического университета. Серия IV: Химия и технология органических веществ. — Вып. XII. — Минск, 2004. — С. 193–196.
9. Шевченко А.А., Казаков А.С. Актуальность переработки лузги семян подсолнечника // Современные парадигмы образования: достижения, инновации, технический прогресс. — 2019. — С. 237–241.
 10. Ambrico M. et al. A photoresponsive red-hair-inspired polydopamine-based copolymer for hybrid photocapacitive sensors // *Advanced Functional Materials*. — 2014. — Vol. 24. — No. 45. — P. 7161–7172.
 11. Forgyat R.V., Tobin J.M. Fungal melanins and their interactions with metal // *Enz. Microb. Technol.* — 1996. — Vol. 19. — P. 311–317.
 12. Glagoleva A.Y., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Melanin pigment in plants: Current knowledge and future perspectives // *Frontiers in Plant Science*. — 2020. — Vol. 11. — P. 770. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00770>.
 13. Keles Y., Özdemir Ö. Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds // *International Journal of Secondary Metabolite*. — 2018. — Vol. 5. — No. 2. — P. 140–148.
 14. Martínez L.M., Martínez A., Gosset G. Production of melanins with recombinant microorganisms // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. — 2019. — Vol. 7. — P. 285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00285>.
 15. Mustafayev S.K., Smychagin E.O. Organization of fodder production based on sunflower seed waste / *International Conference «Actual Issues of Mechanical Engineering» (AIME 2018)*. — Atlantis Press, 2018. — P. 429–434.
 16. Pugh N.D. et al. Melanin: dietary mucosal immune modulator from Echinacea and other botanical supplements // *International Immunopharmacology*. — 2005. — Vol. 5. — No. 4. — P. 637–647.
 17. Ribera J. et al. Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *Armillaria cepistipes* // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2018. — Vol. 67. — No. 1. — P. 132–139.
 18. Tran-Ly A.N. et al. Microbial production of melanin and its various applications // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. — 2020. — Vol. 36. — No. 11. — P. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02941-z>.
 19. Willer H., Travnicek J., Schlatter B. Current status of organic oilseeds worldwide — Statistical update // *OCL*. — 2020. — Vol. 27. — P. 62. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020048>.
 20. Wittkop B., Snowdon R. J., Friedt W. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe // *Euphytica*. — 2009. — Vol. 170. — No. 1. — P. 131–140.
 1. Stavrakova NM. Farmakologicheskiye svoystva fitomelanina. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy* 2014; 4(50):66–72 (in Russian).
 2. Ivanova LA, Fomenko IA, Sergeyeva DA, i dr. Razrabotka tekhnologii polucheniya fitomelaninov iz otkhodov maslichnogo proizvodstva. *Health, Food & Biotechnology* 2019; 2. <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i2.s245> (in Russian).
 3. Kovekhova AV, Zemnukhova LA, Rybin VG. Polifunktsional'nyye materialy iz plodovykh obolochek podsolnechnika. XI Mezhdunarodnaya nauchno-tekhnicheskaya konferentsiya «Sovremennyye problemy ekologii»: Tez. dokl 2014: 48 (in Russian).
 4. Kuznetsova OYu. Razrabotka konditerskikh marmeladnykh izdeliy funktsional'nogo naznacheniya. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* 2013; 16(20):206–210 (in Russian).
 5. Mustafayev SK, Smychagin YeO. Razrabotka kompleksnoy tekhnologii pererabotki otkhodov maslozhirovogo proizvodstva. *Elektronnyy setevoy politematicheskyy zhurnal «Nauchnyye trudy KubGTU»* 2019; 3:883–895 (in Russian).
 6. Пат. РФ 2215761, С09В 61/00, 2003. Способ получения пигмента-красителя из растительного сырья. Огарков Б. Н., Самусенок Л. В. Опубликовано 10.11.2003.
 7. Пат. РФ 2613294, А61К 36/28, В01Д 11/02. Способ получения меланина из лузги подсолнечника. Gracheva NV, Zheltobryukhov VF, Gopovanchikov AB. Опубликован 15.03.2017 (in Russian).
 8. Sushinskaya NV. Polucheniye i fiziko-khimicheskiye svoystva melaninov iz bazidiomitsetov. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya IV: Khimiya i tekhnologiya organicheskikh veshchestv. Vyp XII. Minsk, 2004: 193–196 (in Russian)*.
 9. Shevchenko AA, Kazakov AS. Aktual'nost' pererabotki luzgi semyan podsolnechnika. *Sovremennyye paradigmy obrazovaniya: dostizheniya, innovatsii, tekhnicheskyy progress* 2019:237–241 (in Russian).
 10. Ambrico M et al. A Photoresponsive red-hair-inspired polydopamine-based copolymer for hybrid photocapacitive sensors. *Advanced Functional Materials* 2014; 24(45):7161–7172.
 11. Forgyat RV, Tobin JM. Fungal melanins and their interactions with metal. *Enz Microb Technol* 1996; 19:311–317.
 12. Glagoleva AY, Shoeva OY, Khlestkina EK. Melanin pigment in plants: Current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Plant Science* 2020; 11:770. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00770>.
 13. Keles Y, Özdemir Ö. Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds. *International Journal of Secondary Metabolite* 2018; 5(2):140–148.
 14. Martínez LM, Martínez A, Gosset G. Production of melanins with recombinant microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2019; 7:285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00285>.

References

1. Ivanov AA, Andrianova IYe, Mal'tsev VN, Abrosimova, AN, Bulyzhina TM, Vorozhtsova SV, Severyukhin YUS,

15. Mustafayev SK, Smychagin EO. Organization of fodder production based on sunflower seed waste. International Conference «Actual Issues of Mechanical Engineering» (AIME 2018). Atlantis Press, 2018:429–434.
16. Pugh ND et al. Melanin: dietary mucosal immune modulator from Echinacea and other botanical supplements. International Immunopharmacology 2005; 5(4):637–647.
17. Ribera J et al. Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *Armillaria cepistipes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2018; 67(1):132–139.
18. Tran-Ly AN et al. Microbial production of melanin and its various applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2020; 36(11):1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02941-z>.
19. Willer H, Travnicek J, Schlatter B. Current status of organic oilseeds worldwide – Statistical update. OCL 2020; 27:62. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020048>.
20. Wittkop B, Snowdon R J, Friedt W. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. Euphytica 2009; 170(1):131–140.

PRODUCTION OF WATER-SOLUBLE PHYTOMELANINS USING VARIOUS MINERAL ACIDS

I.A. FOMENKO, L.A. IVANOVA, L.A. CHURMASOVA, I.A. DEGTYAREV

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State University of Food Production»,
Moscow*

The paper considers a modification of the technology for obtaining a water-soluble substance containing phytomelanins from sunflower husks. The purpose of this work is to study the possibility of using phosphoric acid in the release of phytomelanins. It has been shown that when using this acid, it is possible to increase the yield of phytomelanins by 40%, and their adsorption capacity and overall antioxidant activity by 10 and 12%, respectively. A modified technology for obtaining water-soluble phytomelanins is described. The substance obtained in this way, containing phytomelanins, has: adsorption capacity at the level of 91.63 mg of methylene blue / g of substance; total antioxidant activity on a model test system – 32.5%.

Keywords: sunflower husk, melanins, phytomelanins, extraction.

Address:

Fomenko I.A.

Postgraduate Student, Senior Lecturer,

Department of Biotechnology and Technology of Bioorganic Synthesis Products, Moscow State University of Food Production,

E-mail: iv.fomenko@mail.ru

Для цитирования:

Фоменко И.А., Иванова Л.А., Чурмасова Л.А., Дегтярев И.А. Получение водорастворимых фитомеланинов с использованием различных минеральных кислот. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):64–68.

For citation:

Fomenko I.A., Ivanova L.A., Churmasova L.A., Degtyarev I.A. Obtaining water-soluble phytomelanins using various mineral acids. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):64–68 (in Russian).

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ «АРГИНИН-ЖЕЛЕЗО-САХАРОЗНЫЙ АГАР» В ХОДЕ МОНИТОРИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ И СТОЧНЫХ ВОД НА НАЛИЧИЕ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

А.Б. МАЗРУХО^{1*}, Д.И. КАМИНСКИЙ¹, Л.М. ОВSOVA¹, В.В. ЛОБАНОВ¹, В.Д. КРУГЛИКОВ¹,
И.В. АРХАНГЕЛЬСКАЯ¹, Д.В. СОКОВ¹, Е.А. МЕНЬШИКОВА¹, Д.А. ЛЕВЧЕНКО¹,
М.И. ЕЖОВА¹, Е.Ю. ЛЮКШИНА², Ю.Г. КИРЕЕВ², В.В. БАЛАХНОВА²

¹ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,

²ФКУЗ Северо-Кавказская противочумная станция Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Проведено изучение эффективности разработанной питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» (АЖС-агар) в ходе мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов и сточных вод на территории г. Ростова-на-Дону. Установлено, что сконструированная среда может быть эффективно использована для первичной идентификации *Vibrio cholerae*. Выявленная возможность дифференциации вибрионов от близкородственных аэромонад с помощью среды АЖС-агар на этапе отбора подозрительных колоний, подтвержденная параллельным исследованием методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, демонстрирует ее преимущества перед используемыми в практике полиуглеводными средами.

Ключевые слова: холерный вибрион, питательные среды, среды идентификации, мониторинг водных объектов, лабораторная диагностика холеры.

Введение

Важной составляющей эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации является мониторинг воды поверхностных водоемов и сточных вод на наличие холерного вибриона [6]. Эффективность проводимого мониторинга во многом определяется чувствительностью, специфичностью и стабильностью используемых в лабораторной диагностике холеры питательных сред, агглютинирующих сывороток, наборов реагентов и диагностических тест-систем. Среда и микротест-системы, используемые в настоящее время для идентификации штаммов холерного вибриона, многообразны, обеспечивают изучение биохимических признаков, в том числе ферментацию углеводов и аминокислот [4, 12, 16]. Первичная идентификация при

проведении лабораторной диагностики холеры осуществляется на этапе отбора подозрительных колоний, выросших на щелочном агаре или селективной дифференциальной среде типа TCBS в результате прямого посева пробы на них или после ее пассажа через первую и вторую среды обогащения. Одним из трех ключевых тестов, используемых для первичной идентификации холерного вибриона, является посев материала подозрительных колоний в полиуглеводные среды — лактозо-сахарозную, маннозо-сахарозную, среды Клигlera и Ресселя [1, 13, 15]. Однако с помощью полиуглеводных сред невозможна дифференциация вибрионов от представителей близкородственных глюкозо- и сахарозопозитивных микроорганизмов (*Aeromonas*, *Plesiomonas*) [7, 8, 10, 11, 14], имеющих сходную морфологию колоний на щелочном агаре и их идентичный желтый цвет на среде TCBS. В результате для окончательной идентификации с использованием сред цветного ряда или микротест-систем отбираются колонии микроорганизмов, относящиеся не только к роду *Vibrio*, но и близкородственных (прежде всего, аэромонад), что существенно увеличивает объем исследований и материальные затраты на последующем VI этапе лабораторной диагностики холеры [5].

Указанных недостатков лишена разработанная специалистами ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» питательная среда

© 2021 г. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Овсова Л.М., Лобанов В.В., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Соков Д.В., Меньшикова Е.А., Левченко Д.А., Ежова М.И., Люкшина Е.Ю., Киреев Ю.Г., Балахнова В.В.

* **Автор для переписки:**

Мазрухо Алексей Борисович

канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории питательных сред ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

E-mail: Alexey-mazrukho@rambler.ru, plague@aanet.ru

для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний «Аргинин-железо-сахарозный агар» (АЖС-агар), принцип действия которой основан на идентификации холерного вибриона и его дифференциации от микроорганизмов сопутствующей ему в пробах клинического материала и объектов окружающей среды микрофлоры (аэромонад, кишечной палочки и протей) сразу по трем признакам: ферментации ключевого углевода (сахарозы), отсутствию дегидролазы аргинина, а также отсутствию способности к образованию сероводорода.

Специфичность разработанной среды, определяемая биологическим показателем «дифференцирующие свойства», воспроизводимость получаемых при ее использовании результатов ранее неоднократно были подтверждены в ходе авторских, межлабораторных, квалификационных, технических, клинических испытаний и предрегистрационной валидации.

Сконструированная питательная среда АЖС-агар успешно прошла процедуру государственной регистрации в качестве изделия медицинского назначения. Получено регистрационное удостоверение от 03 июня 2020 года № РЗН 2020/10543. Приказом Росздравнадзора от 03.06.2020 г. № 4635 питательная среда АЖС-агар допущена к обращению на территории Российской Федерации.

Целью настоящей работы явилась оценка эффективности разработанной питательной среды АЖС-агар в ходе мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов и стоков на наличие холерного вибриона.

Материалы и методы

Эффективность разработанной питательной среды АЖС-агар изучали в ходе планового мониторинга воды поверхностных водоемов и сточных вод на территории г. Ростова-на-Дону на базе двух учреждений: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» и ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция». Исследования проводили в соответствии с требованиями МУ 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [5].

Состав опытной среды АЖС-агар (выпускаемой по ТУ 20.59.52-001-01898316-2019, регистрационное удостоверение от 03.06.2020 года № РЗН 2020/10543) на 1,0 л среды (г/л): пептон ферментативный для бактериологических целей сухой — $1,0 \pm 0,02$; натрий хлористый — $5,0 \pm 0,50$; L-аргинин солянокислый — $1,30 \pm 0,30$; сахароза — $1,0 \pm 0,02$; натрий серноватисто-кислый 5-водный — $0,30 \pm 0,02$; соль закиси железа и аммония двойная сернокислая 6-водная (Соль Мора) — $0,20 \pm 0,01$; калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный — $0,30 \pm 0,01$; агар микробиологиче-

ский — $12,0 \pm 1,0$; бромтимоловый синий водорастворимый — $0,08 \pm 0,001$; крезоловый красный водорастворимый — $0,015 \pm 0,001$; вода дистиллированная — до 1,0 литра.

В исследовании были использованы три серии разработанной питательной среды АЖС-агар: серии 6 от 06.07.2020 г., 7 от 13.07.2020 г. и 8 от 20.07.2020 г. Срок годности указанных серий — 07.2021 г.

Контрольной средой являлась зарегистрированная в установленном порядке питательная среда «Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (Агар Клигера — ГРМ)» по ТУ 9398-030-78095326-2007, РУ № ФСР 2007/00968 от 13.10.2011 г. производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск (серия 396, годен до 06.2021)», используемая в практике лабораторной диагностики холеры для отбора подозрительных колоний и культур для дальнейшей идентификации.

Мониторинговые исследования проводили на общепринятых для этой цели питательных средах:

- «Питательная среда для накопления холерного вибриона сухая «Пептон основной сухой» по ТУ 9385-038-78095326-2008, РУ № ФСР 2009/05472 от 17.10.2011 г., серия О37-К-16, срок годности 08.2022 г. производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск;

- «Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона сухая «Щелочной агар» по ТУ 9385-039-78095326-2008, РУ № ФСР 2009/05473 от 17.10.2011 г., серия 197, срок годности 09.2021 г. производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск.

Тип анализируемого образца в настоящем исследовании — колонии микроорганизмов, подозрительные на принадлежность к виду *V. cholerae*, выросшие на щелочном агаре в результате посева на него проб материала из объектов окружающей среды (вода поверхностных водоемов, хозяйственно-бытовые сточные воды) в нативном (прямой посев пробы на щелочной агар) или обогащенном (прошедшие пассаж через среды обогащения — основной пептон и 1% пептонную воду) вариантах.

Были исследованы 375 подозрительных колоний. Материал каждой подозрительной колонии заседали полной бактериологической петлей № 2 в столбик и скошенную часть предварительно разлитых по пробиркам в количестве по 8,0 мл питательных сред АЖС-агар и Клигера. При необходимости биомассу каждой колонии наращивали путем посева ее материала на пластинки щелочного агара. Культивирование пробирок с посевами осуществляли при $+37^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. Результат оценивали по изменению цвета столбика и скошенной части сред в соответствии с интерпретацией, представленной в «Инструкциях по применению»

на данные препараты. Подтверждение родовой и видовой принадлежности микроорганизма, сформировавшего исследуемые колонии, проводили с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии [2, 3, 9].

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что при посеве в опытную питательную среду АЖС-агар наблюдалась четкая дифференциация между собой вибрионов и аэромонад при идентичной морфологии их колоний на щелочном агаре. Вибрионы вызывали изменение цвета столбика и скошенной части среды от исходного зеленого к желтому без образования черного преципитата сульфида железа, то есть проявляли свои типичные биохимические свойства, соответствующие таксономическому положению: способность к ферментации сахарозы, отсутствие фермента дегидролазы аргинина и способности образовывать сероводород. Аэромонады при посеве в питательную среду АЖС-агар изменяли цвет столбика и скошенной части от исходного зеленого к синему вследствие накопления щелочных продуктов из-за ферментации аргинина, которое с 8–12 часа культивирования начинает доминировать над накоплением кислых продуктов, образующихся при ферментации саха-

розы. При этом продукция сероводорода, как и при посеве вибрионов, отсутствовала. Использование контрольной питательной среды Клигера не позволяло дифференцировать между собой колонии вибрионов и аэромонад. Оба микроорганизма вызывали идентичное изменение цвета столбика среды от исходного красного к желтому вследствие ферментации глюкозы при отсутствии изменения цвета скошенной части среды, так как и вибрионы и аэромонады не ферментируют лактозу.

Среди исследованных 375 подозрительных на холерный вибрион колоний с помощью среды АЖС-агар обнаруживались преимущественно колонии микроорганизмов рода *Vibrio* – 296 колоний и представителей рода *Aeromonas* – 74 колонии. При посеве в пробирки со средой Клигера все отобранные подозрительные колонии проявили идентичные свойства и отобрать среди них колонии вибрионов не представлялось возможным.

Было проведено сравнительное изучение трех вариантов идентификации микроорганизмов, формирующих подозрительные на холерный вибрион колонии: с помощью посевов в среды АЖС-агар и Клигера, а также метода MALDI-TOF масс-спектрометрии (табл. 1). Для данного эксперимента была отобрана 81 подозрительная на принадлежность к холерному вибриону колония.

Таблица 1

Сравнение вариантов идентификации микроорганизмов, формирующих подозрительные на холерный вибрион колонии при культивировании на щелочном агаре

Принадлежность колоний к роду микроорганизмов	Число колоний, идентифицируемая с помощью		
	посева в АЖС-агар	посева в агар Клигера	метода MALDI-TOF MS
<i>Vibrio</i>	66	Дифференциация колоний невозможна	66
<i>Aeromonas</i>	14		15
<i>Proteus</i>	1	нет	нет

Анализ результатов показал совпадение родовой принадлежности исследуемых микроорганизмов при параллельном использовании посева в среду АЖС-агар и метода MALDI-TOF масс-спектрометрии на 98,8%. При этом регистрировалось полное совпадение результатов использования обоих указанных методов при идентификации всех колоний, относящихся к роду *Vibrio*. Только одна колония, отнесенная с помощью питательной среды АЖС-агар к роду *Proteus*, не была подтверждена на принадлежность к этому роду методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (по результатам данного метода колония отнесена к аэромонадам). Так как результаты посева в среду Клигера не позволяли дифференцировать колонии вибрионов от колоний аэромонад, они не могут быть корректно сопоставлены с результатами исследования колоний методом масс-спектрометрии.

Результаты проведенной апробации сконструированной питательной среды АЖС-агар в ходе плановых мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов и стоков на территории г. Ростова-на-Дону свидетельствуют о высокой эффективности ее применения на этапе отбора подозрительных колоний, подтвержденной параллельными исследованиями методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Принимая во внимание, что одной из главных проблем отбора подозрительных на принадлежность к *V. cholerae* колоний со щелочного агара или селективной дифференциальной среды TCBS с помощью полиуглеводных сред в мониторинговых исследованиях воды поверхностных водоемов и хозяйственно-бытовых сточных вод является отсутствие возможности достоверной дифференциации между вибрионами и близкородствен-

ными аэромонадами, представляется целесообразным использование для этой цели разработанной питательной среды для первичной идентификации холерного вибриона АЖС-агар. Данная среда не имеет аналогов в мировой практике и является единственной из всего ассортимента предложенных ранее сред первичной идентификации холерного вибриона, позволяющей на этапе отбора колоний провести его дифференциацию от представителей рода *Aeromonas*. Внедрение разработанной среды в практику лабораторной диагностики холеры даст возможность существенно сократить объем исследований на последующем этапе окончательной идентификации возбудителя и снизить материальные затраты на его проведение.

Заключение

На основании проведенного исследования сделаны следующие выводы:

1. Продемонстрирована высокая эффективность применения разработанной питательной среды АЖС-агар на этапе отбора подозрительных на принадлежность к *V. cholerae* колоний в ходе мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов и хозяйственно-бытовых сточных вод на наличие холерного вибриона.
2. Разработанная среда АЖС-агар является единственной из используемых в микробиологической практике на этапе отбора подозрительных колоний питательных сред, позволяющей дифференцировать между собой вибрионы и аэромонады.
3. Возможности питательной среды АЖС-агар в аспекте первичной идентификации микроорганизмов, формирующих подозрительные на холерный вибрион колонии, подтверждены параллельными исследованиями методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.
4. Перспективно, целесообразно и экономически выгодно включение разработанной питательной среды АЖС-агар в Методические указания «Лабораторная диагностика холеры» и ее внедрение в практику работы микробиологических лабораторий территориального, регионального и федерального уровней.

Литература

1. Адамов А.К., Наумишина М.С. Холерные вибрионы. — Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 1984. — 328 с.
2. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*

// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2014. — № 3. — С. 22–29.

3. Котенева Е.А. Основные тенденции использования MALDI-TOF масс-спектрометрии в работе микробиологических и клинических лабораторий / Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. — Иркутск, 2017. — С. 72–73.
4. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. — М.: ЗАО «ШИКО», 2013. — 560 с.
5. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания. МУ 4.2.2218-07. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. — 87 с.
6. 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. — № 2. — С. 249–256.
7. Abbott S.L., Cheung W.K.W., Janda J.M. The genus *aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes // J. of Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — No. 6. — P. 2348–2357.
8. Bonev S.I., Zakhariiev Z., Gentchev P. Comparative study of media for determination of lysine decarboxylase activity // Appl. Microbiol. — 1974. — Vol. 27. — No. 3. — P. 464–468.
9. Coelho A., de Oliveira Santos E., Faria M.L., de Carvalho D.P., Soares M.L., von Kruger W.M. et al. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* by 2DE and MALDI-TOF MS/MS // Wei Sheng Wu Xue Bao. — 2009. — Vol. 49(6). — P. 746–758.
10. Erdem B., Kariptas E., Cil E., Isik K. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from food samples in Turkey // Turk. J. Biol. — 2011. — Vol. 35. — No. 1. — P. 463–472.
11. Janda J.M., Abbott S.L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection // Clin. Microbiol. Rev. — 2010. — Vol. 23. — No. 1. — P. 35–73.
12. Kaper J.B., Morris J.G., Levin M.M. Cholera // Clin. Microbiol. Rev. — 1995. — Vol. 8. — No. 1. — P. 48–86.
13. Kligler I.J. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group // Am. J. Public Health. — 1917. — Vol. 7. — P. 1042–1044.
14. Pazzaglia G., Sack R.B., Salazar E. et al. High frequency of coinfecting enteropathogens in *Aeromonas*-associated diarrhea of hospitalized Peruvian infants // J. of Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29. — No. 6. — P. 1151–1156.
15. Russel F.F. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium // J. Med. Res. — 1911. — Vol. 25. — P. 217.
16. Thompson F.L., Iida T., Swings J. Biodiversity of vibrios // Microbiol. and Mol. Biol. Rev. — 2004. — Vol. 68. — No. 3. — P. 403–431.

References

1. Adamov AK, Naumshina MS. Kholernyye vibriony. Saratov: Izd-vo Saratovsk. un-ta, 1984: 328. (in Russian).
2. Afanas'yev MV, Mironova LV, Basov YeA, Ostyak AS, Kulikalova YeS, Urbanovich LYA, Balakhonov SV. MALDI-TOF mass-spektrmetricheskii analiz v uskorennoy identifikatsii mikroorganizmov roda *Vibrio*. Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya 2014; 3:22–29 (in Russian).
3. Koteneva YeA. Osnovnyye tendentsii ispol'zovaniya MALDI-TOF mass-spektrmetrii v rabote mikrobiologicheskikh i klinicheskikh laboratoriy. Materialy IX Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh i spetsialistov Rospotrebnadzora. Irkutsk, 2017: 72–73 (in Russian).
4. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney: Prakticheskoye rukovodstvo. Pod red GG Onishchenko, VV Kutyreva. Moscow: ZAO «SHIKO», 2013: 560 (in Russian).
5. Laboratornaya diagnostika kholery. Metodicheskiye ukazaniya. MU 4.2.2218-07. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2007: 87 (in Russian).
6. Onishchenko GG, Moskvitina EA, Kruglikov VD, Titova SV, Adamenko OL, Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO. Epidemiologicheskii nadzor za kholeroy v Rossii v period sed'moy pandemii. Vestnik RAMN 2015; 2:249–256 (in Russian).
7. Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM. The genus aeromonas: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J of Clin Microbiol 2003; 41(6):2348–2357.
8. Bonev SI, Zakhariyev Z, Gentchev P. Comparative study of media for determination of lysine decarboxylase activity. Appl Microbiol 1974; 27(3):464–468.
9. Coelho A, de Oliveira Santos E, Faria ML, de Carvalho DP, Soares ML, von Kruger WM et al. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* by 2DE and MALDI-TOF MS/MS. Wei Sheng Wu Xue Bao 2009; 49(6):746–758.
10. Erdem B, Kariptas E, Cil E, Isik K. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from food samples in Turkey. Turk J Biol 2011; 35(1):463–472.
11. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev 2010; 23(1):35–73.
12. Kaper JB, Morris JG, Levin MM. Cholera. Clin Microbiol Rev 1995; 8(1):48–86.
13. Kligler IJ. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. Am J Public Health 1917; 7:1042–1044.
14. Pazzaglia G, Sack RB, Salazar E et al. High frequency of coinfecting enteropathogens in *Aeromonas*-associated diarrhea of hospitalized Peruvian infants. J of Clin Microbiol 1991; 29(6):1151–1156.
15. Russel FF. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. J Med Res 1911; 25:217.
16. Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. Microbiol and Mol Biol Rev 2004; 68(3):403–431.

STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE NUTRIENT MEDIUM «ARGININE-IRON-SUCROSE AGAR» DURING MONITORING STUDIES OF WATER IN SURFACE RESERVOIRS AND WASTEWATER FOR THE PRESENCE OF *VIBRIO CHOLERAE*

A.B. MAZRUKHO¹, D.I. KAMINSKY¹, L.M. OVSOVA¹, V.V. LOBANOV¹, V.D. KRUGLIKOV¹,
I.V. ARKHANGELSKAYA¹, D.V. SOKOV¹, E.A. MENSHIKOVA¹, D.A. LEVCHENKO¹,
M.I. EZHOVA¹, E. Yu. LYUKSHINA², Yu.G. KIREEV², V.V. BALAKHNOVA²

¹Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor,

²North Caucasus Anti-Plague station of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

The effectiveness of the developed nutrient medium «Arginine-iron-sucrose agar» (AIS-agar) was studied during monitoring studies of surface water reservoirs and wastewater in the city of Rostov-on-Don. It is established that the constructed environment can be effectively used for primary identification of *Vibrio cholerae*. The revealed possibility of differentiating vibrios from closely related aeromonads using AIS-agar medium at the stage of selection of suspicious colonies, confirmed by a parallel study using MALDI-TOF mass spectrometry, demonstrates its advantages over poly-carbohydrate media used in practice.

Keywords: *Vibrio cholerae*, culture media, identification media, water monitoring, laboratory diagnostics of cholera.

Address:

Mazrukho Aleksey Borisovich, Ph.D.

Leading Researcher, Laboratory of Nutrient Media,

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor
E-mail: Alexey-mazrukho@rambler.ru; plague@aaanet.ru.

Для цитирования:

Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Овсова Л.М., Лобанов В.В., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Соков Д.В., Меньшикова Е.А., Левченко Д.А., Ежова М.И., Люкшина Е.Ю., Киреев Ю.Г., Балахнова В.В. Изучение эффективности питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» в ходе мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов и сточных вод на наличие холерного вибриона. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):69–74.

For citation:

Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Ovsova L.M., Lobanov V.V., Kruglikov V.D., Arkhangelskaya I.V., Sokov D.V., Menshikova E.A., Levchenko D.A., Ezhova M.I., Lyukshina E.Yu., Kireev Yu.G., Balakhnova V.V.. Study of the effectiveness of the nutrient medium «Arginine-iron-sucrose agar» during monitoring studies of water in surface reservoirs and wastewater for the presence of *Vibrio cholerae*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):69–74 (in Russian).

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ КАК НОВОЙ МЕЖДИСЦИПЛИНАРНОЙ ОБЛАСТИ КОНВЕРГЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ С ВЫСОКИМ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

К.Г. ГАЕВ^{1*}, Т.Н. ГАЕВА², Р.Г. ВАСИЛОВ²

¹ *Московская международная школа,*

² *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*

В обзоре прослежено формирование синтетической биологии как нового научного направления с высоким технологическим потенциалом и дихотомией возможностей, с одной стороны, созидательных, а с другой — несущих риски и угрозы здоровью человека и состоянию природной среды. Сделана попытка выявить взаимосвязь между отсутствием общепризнанной интерпретации термина «синтетическая биология» и несформированностью на международном и национальном уровнях прямого нормативно-правового регулирования соответствующей сферы, призванного контролировать риски, сдерживать и предотвращать угрозы биобезопасности. Показаны особенности синтетической биологии, расширяющие границы ее предметной области за пределы геной инженерии. Проанализированы некоторые аспекты развития синтетической биологии в Российской Федерации. Особое внимание уделено актуальному вопросу подготовки кадров для нового междисциплинарного направления конвергентных исследований.

Ключевые слова: междисциплинарные конвергентные исследования, синтетическая биология, геной инженерия, биологическая инженерия, редактирование генома, ксенобиология, синтетический геном, минимальный геном, клетки-фабрики, биозащита, биобезопасность, технологии двойного назначения, постгеномное оружие.

Формирование синтетической биологии как нового научного направления

Синтетическая биология (СБ), по результатам своего пятидесятилетнего развития и потенциальным возможностям, является новым научным направлением, поистине, революционизирующим образ жизни и сознание человека [18, 22]. СБ базируется на созданных в 1970–1980-х годах методах молекулярной биологии и генетики, сформировавших инструментарий геной инженерии для выполнения различных манипуляций с генами, воспроизводящих природные процессы: секвенирование ДНК и полимеразная цепная реакция (ПЦР) *in vitro* как подобие процесса репликации ДНК в живых системах, вставка фрагментов ДНК (рекомбинантой рДНК с рестрикционными ферментами и лигазами) в геном — как аналог процессов рекомбинации и репарации ДНК. Однако только этих методов и технологий оказалось недостаточно для формирования СБ как нового научного направления. Ее дальнейшее развитие, выходящее

за рамки геной инженерии, было предопределено, главным образом, следующими факторами.

Во-первых, появились технологии метагеномных исследований и секвенирования генома нового поколения (NGS), позволяющие одновременно считывать сотни миллионов коротких последовательностей ДНК и снизившие более чем в 2 миллиона раз стоимость прочтения одного генома: с 2,7 млрд долларов США в 1991 г. в рамках первого открытого международного научного проекта «Геном человека» (Human Genom Project) до 1000 долларов США — в предложениях коммерческих компаний в 2016 г. [19]. В течение десятилетия после завершения проекта ряд дальнейших инструментальных разработок превратил секвенирование в доступный и широко применяемый метод, обусловивший взрывной рост в области генерации данных на уровне генов. Это совпало с параллельной «революцией» в информационных технологиях, аппаратном и программном обеспечении, что позволило обрабатывать и анализировать огромные объемы данных и углубить знания о взаимосвязи между биологической формой и функцией на уровне гена [18]. Другие новейшие технологии геной инженерии сделали возможным редактирование генома не только *in vitro*, но и в живых системах *in vivo* с использованием такого перспективного инструмента редактирования, как система CRISPR-Cas9.

© 2021 г. Гаев К.Г., Гаева Т.Н., Василев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Гаев Климент Геннадьевич

Ученик 11 класса Московской международной школы

E-mail: gaevklim@gmail.com

Во-вторых, благодаря бурному развитию в последние десятилетия кластера НБИКС-технологий и новых научных подходов в виде междисциплинарных и конвергентных исследований, попытка сопряжения биологических методов с инженерными принципами рационального проектирования и построения сложных технических систем из более простых блоков оказалась успешной и открыла большие возможности в сфере геномных исследований и трансформаций, что, по- существу, обозначило область предметных задач и целей СБ, предусматривающих переход от небольших манипуляций с генами и фрагментами ДНК к масштабному перепрограммированию генома, синтезу генов, а в перспективе — к созданию новых организмов с заданными свойствами «с нуля» (*de novo*), с набором генов, не встречающихся в природе [32].

По мнению Ressoud J. (2008) [31], технологии синтеза генов *de novo* катализировали переход от лабораторных методов традиционной генной инженерии к разработке процессов производства в промышленных масштабах. Являясь примером успешного развития конвергентных подходов, СБ активно использует методы многих научных дисциплин (инженерных наук, микробиологии, биохимии, генной инженерии, информационных технологий, нанотехнологий и др.), но в наибольшей степени — системной инженерии, поддерживающей исследования на двух уровнях: по дизайну отдельных компонентов или модулей биологических систем для создания желаемой функциональности и по конструированию структуры их взаимосвязей, а также механизмов, обеспечивающих действенность таких связей и образуемых ими сетей [14, 33].

В сфере СБ в настоящее время выделяют четыре основных направления исследований [2, 30, 32, 34]:

1. *Биологическая инженерия in silico; рациональный дизайн биологических схем/сетей на основе ДНК* (проектирование последовательностей ДНК с предсказуемыми дискретными функциями, которые могут модульно сочетаться в различных клетках-хозяевах). Это — доминирующее направление, находящее свое воплощение в создании искусственных «клеток-фабрик», выполняющих каскад заданных реакций на основе синтетических метаболических процессов. Исследования в данной области фокусируются на проблемах метаболической инженерии, связанных с регуляцией экспрессии генов, отвечающих за выработку ферментов, катализирующих реакции синтеза целевых химических продуктов «клеткой-фабрикой».

2. *Определение минимального жизнеспособного генома путем удаления одного или нескольких*

генов и/или перенесения отдельных генов из одного созданного природой организма в другой (подход top-down/«сверху-вниз»). Впервые данный подход был реализован в 2016 г., когда в лаборатории Крейга Вентера (John Craig Venter) была сконструирована клетка с минимальным геномом в составе 473 генов путем удаления участков ДНК бактерии *M. mycoides* в количестве 428 генов, не принципиальных для ее выживания [23]. Путем добавления дополнительных генов к минимальному геному возможно создание новых форм жизни, например, бактерий с нужными свойствами.

3. *Конструирование протоклеток или синтетических клеток «с нуля» из более простых конструктивных блоков, состоящих, в свою очередь, из еще более элементарных частей*, аналогично тому, как это делается при создании инженерно-технических систем (подход down-top/«снизу-вверх»). В СБ такими элементами являются фрагменты ДНК, и в 2000-х годах был создан стандарт работ по изготовлению и хранению этих генетических элементов — BioBricks (биокирпичей), каждый из которых состоит из кодирующей последовательности с «пришитыми» к ней с двух сторон «техническими» элементами, необходимыми для сборки биокирпичей. Все эти составляющие заключены в плазмиду, содержащую инструкции для копирования в клетке-хозяине. С использованием данного стандарта при Массачусетском технологическом институте (MIT, США) был создан крупнейший общедоступный Банк-реестр стандартных биологических элементов (Registry of Standard Biological Parts) (partsregistry.org) [21].

4. *Разработка ортогональных биологических систем (ксенобиология)*. Одна из ключевых задач в этой области — создание ортогональной хромосомы — ксенохромосомы (ХНА) из ксенонуклеиновых кислот, настолько отличной от ДНК и РНК из-за многочисленных структурных изменений, что этот новый биополимер, хранящий информацию, не распознаваем природными биологическими системами. Эта особенность рассматривается учеными как способ реализации генетического брандмауэра — надежного инструмента биобезопасности, препятствующего обмену генетической информацией ксеноорганизма с природным миром [33].

Развитие понятийно-терминологического аппарата: конвергентные исследования и синтетическая биология

При всей сложности и противоречивости применения технологий СБ до настоящего времени так и

не сложилось консенсуса относительно определения понятия «синтетическая биология», как не сформирован окончательно и понятийно-терминологический аппарат в этой области в целом [15, 20, 30, 38, 39]. По меткому замечанию одного исследователя: «Если вы попросите пятерых синтетических биологов дать определение области, в которой они работают, то получите шесть совершенно различных определений» [35]. Хотя наличие общепринятой интерпретации термина «синтетическая биология» способствовало бы уточнению рамок ее предметной области, а также рациональному обсуждению проблем контроля, нормативного регулирования и социального восприятия соответствующих технологий и продуктов [30].

Междисциплинарность и конвергентный характер СБ являются важным отличительным признаком данного научного направления [18]. В связи с этим представляется целесообразным попытаться внести несколько большую определенность и в понятие «конвергенции», также не имеющего пока общепризнанного толкования. Как известно, конвергенция знаний охватывает широкий спектр научных областей, определяемых буквенным сочетанием НБИКС (нано-, био-, инфо-, когно-, социо-), хотя и не ограничивающихся только этими областями знания. Явление конвергенции в науке становится все более всеобъемлющим, охватывая новые научные дисциплины. Для конкретизации понятийного аппарата в конвергентных научных сферах целесообразно, прежде всего, провести разграничение между «конвергентными научными исследованиями» и «конвергентными технологиями», что поможет в их терминологической идентификации. Отличительная характеристика, позволяющая выделить конвергентные научные исследования и разработки в отдельную группу, может быть заимствована из распространенного сегодня общего понимания конвергентных областей НБИКС, но уточнена следующим образом.

Конвергентными исследованиями можно назвать междисциплинарные фундаментальные и прикладные исследования, в которых получение новых знаний, а также новых качественных характеристик и функциональных свойств материалов, продуктов, объектов и явлений основывается на интегральном применении инструментов, подходов и методов, свойственных различным научно-технологическим областям НБИКС кластера, чем обеспечиваются высокий синергетический эффект и результаты, принципиально недостижимые в рамках монодисциплинарного развития.

Если принять за основу такое понимание «конвергентных исследований», то для «конвергентных

технологий» можно дать следующее определение. К конвергентным технологиям относятся результаты интеллектуальной деятельности, комплексные разработки интегрированного междисциплинарного типа, доведенные до возможности стандартизированного воспроизводства и масштабного применения, которые могут быть использованы для получения новых, обладающих уникальными качествами материалов, продуктов, процессов, свойств и явлений.

В соответствии с предложенными определениями такие, например, темы научных исследований в области синтетической биологии, как создание искусственных генетических конструкций, штаммов-продуцентов биологически активных соединений или структурно-функциональные исследования макромолекул, ключевых клеточных наномашин, биомембран и простейших организмов, будут отнесены к конвергентным исследованиям, а способная нарабатывать целевые вещества живая клетка *in silico*, полученная, в том числе, и в результате этих исследований, — к конвергентным технологиям. Более того, в данном случае речь будет идти о конвергентных природоподобных технологиях, и тогда определение этого класса технологий может выглядеть следующим образом.

К конвергентным природоподобным технологиям относятся технологии, разработанные с применением конвергентных методов исследования и воспроизводящие принципы, механизмы, процессы, явления и свойства объектов живой природы в виде технических систем и технологических процессов, а также явлений и свойств объектов, интегрированных в естественный природный ресурсооборот.

Предложенное здесь разграничение понятий представляется своевременным, отражая тот факт, что к настоящему времени сложилась многоуровневая структура, связанная с конвергенцией в науке, включающая в себя конвергентные области знания, конвергентные исследования, конвергентные технологии (продукты) и конвергентные природоподобные технологии (продукты).

Как считает основатель и президент Всемирного экономического форума в Давосе К. Шваб (Klaus Martin Schwab), процессы конвергенции в виде растущей гармонизации и интеграции большого количества различных научных дисциплин и практических применений являются отличительным признаком 4-й промышленной революции (Industry 4.0). Он отмечает: «Материальные инновации, возникающие в результате взаимозависимости между различными технологиями, более не являются научной фантастикой. К примеру, сегодня цифровые технологии производства могут взаимодействовать с био-

логическим миром. Некоторые дизайнеры и архитекторы уже совмещают автоматизированное проектирование, аддитивные технологии, инжиниринг материалов и синтетическую биологию для новаторских разработок систем взаимодействия между микроорганизмами, нашими организмами, потребляемыми нами продуктами и даже зданиями, в которых мы живем. Для этого они создают (и даже «выращивают») объекты, которые постоянно изменяются и адаптируются (отличительные признаки растительного и животного мира)» [12].

Такая эволюция характера научных исследований в направлении большего сближения и взаимного проникновения различных областей знаний объясняется тем, что формируемые обществом эссенциальные запросы требуют для их удовлетворения все более усложняющихся технологий и качественно новых продуктов (материальных и виртуальных).

СБ приобрела выраженный конвергентный характер благодаря концептуальной и технологической интеграции в ее научную сферу трех инженерных принципов, которые сделали реалистичными биологические исследования, непредставимые ранее по сложности и масштабу [2]:

- автоматизация — применение роботизированных систем для выполнения экспериментальной работы и компьютерных программ для проектирования биологических систем;

- абстракция — построение абстрактных иерархических моделей, где на каждом уровне учитываются только наиболее значимые параметры подсистем, а детализация характерна для нижних уровней. Этим упрощается работа со сложноорганизованными системами: специалисты на каждом уровне должны обладать квалификацией и компетенциями, необходимыми только для данного уровня;

- стандартизация — разработка единых протоколов и стандартов по конструированию биологических систем (что облегчает, ускоряет и удешевляет выполнение сложных технологических процессов), а также создание единых банков биологической информации (биобанков, генетических банков, биорепозитория и др.).

Поистине безграничные возможности СБ, обращенные в будущее, позволяют назвать ее футуристической областью науки, которая стремится овладеть механизмами жизни [41]. Это эмоционально окрашенное определение, в целом, правильно характеризует суть СБ, но не является научным. Наблюдаемое в литературных источниках разнообразие в понимании «синтетической биологии» зависит от того, апеллируют ли авторы в большей степени к появлению новых научных подходов,

возможностей и к будущим перспективам данного направления, либо рассматривают СБ как развитие методов генной инженерии, или, в более широком смысле, как часть континуума современного биотехнологического развития [13, 18, 20, 24, 38, 39]. Несмотря на многолетние дебаты, данный вопрос не находит окончательного решения, хотя, по нашему мнению, отсутствие здесь определенности служит значительным препятствием в обеспечении гарантий созидательной и безопасной реализации потенциала СБ.

В Европейском союзе наиболее распространено рабочее определение СБ, выработанное в 2014 г. Научным комитетом по оценке рисков для здоровья и окружающей среды, действующим в составе Европейской комиссии, которое рассматривает синтетическую биологию как «область применения научных знаний, технологий и инженерии с целью упрощения и ускорения разработки, производства и/или модификации генетического материала в живых организмах» [28]. Это определение квалифицирует СБ как продолжение классической генной инженерии. Подобный же подход в определении синтетической биологии преобладает и в США.

На первый взгляд, действительно трудно провести грань между генной инженерией и синтетической биологией. Синтетическая биология, безусловно, использует весь набор методов генной инженерии, но вряд ли в полной мере справедливо мнение, что она — лишь следующая ступень в их развитии, так как за счет междисциплинарности выходит далеко за пределы технологических возможностей, обеспечиваемых генно-инженерными методами. Во-первых, конвергентный характер исследований вынуждает вырабатывать новые подходы и новые методы, специфичные для области синтетической биологии, что позволяет решать гораздо больший спектр научно-практических задач. Во-вторых, в отличие от генной инженерии, которая работает с молекулами ДНК природного происхождения, СБ и здесь расширяет границы, конструируя искусственные аналоги и меняя парадигму классической биологии «живое из живого» (генно-модифицированные организмы) на «живое из неживого» (синтетически-модифицированные организмы). Необходимо отметить, что СБ в настоящее время находится пока на ранних стадиях своего развития и поэтому еще совсем недалеко ушла от классической генной инженерии. Судя по тем задачам, которые ставит перед собой СБ на перспективу (создание альтернативной жизни), ее дальнейшее развитие будет увеличивать этот разрыв. Еще одним свидетельством правомерности выделения

СБ в самостоятельную научно-практическую область является факт формирования специализированных рынков продуктов и технологий синтетической биологии.

Таким образом, исходя из приведенной выше аргументации и учитывая наиболее распространенные дефиниции, предлагаемые авторами научных статей и обзоров, можно сформулировать общее представление о синтетической биологии как о новом междисциплинарном конвергентном направлении науки, охватывающем исследования и технологии, ориентированные:

- на создание с использованием принципов рационального проектирования и конструирования не существующих в природе биологических систем, организмов и/или их компонентов (включая геномы) *de novo* с устойчивым и предсказуемым функциональным поведением, и/или
- на реконструкцию существующих природных биологических систем и их геномов для фундаментальных исследований и получения полезных продуктов [13, 41, 38, 39].

В предложенном нами определении акцентированы четыре ключевых аспекта синтетической биологии: междисциплинарность, инженерное проектирование

(дизайн), манипуляции с генетическим материалом природного и искусственного происхождения и принцип предсказуемости функционального поведения создаваемых биологических систем или организмов.

Перспективы коммерциализации технологий синтетической биологии

Накопленный к настоящему времени научно-технологический потенциал СБ и темпы ее развития дают возможность рассчитывать на решение многих глобальных проблем человечества в области медицины, экологии, энергетики, продовольственной безопасности и др. Особенно большие ожидания связывают с разработкой новых биологических организмов, обеспечивающих функции, необходимые для развития высокотехнологичного промышленного производства, эффективной и безопасной утилизации отходов, обнаружения и очистки воды, производства биотоплив, продуктов тонкой химии, создания биокомпьютеров, уникальных фармацевтических субстанций, вакцин, медицинских изделий, диагностикумов и препаратов, биополимеров, биоматериалов и биокомпозитов (рис. 1).

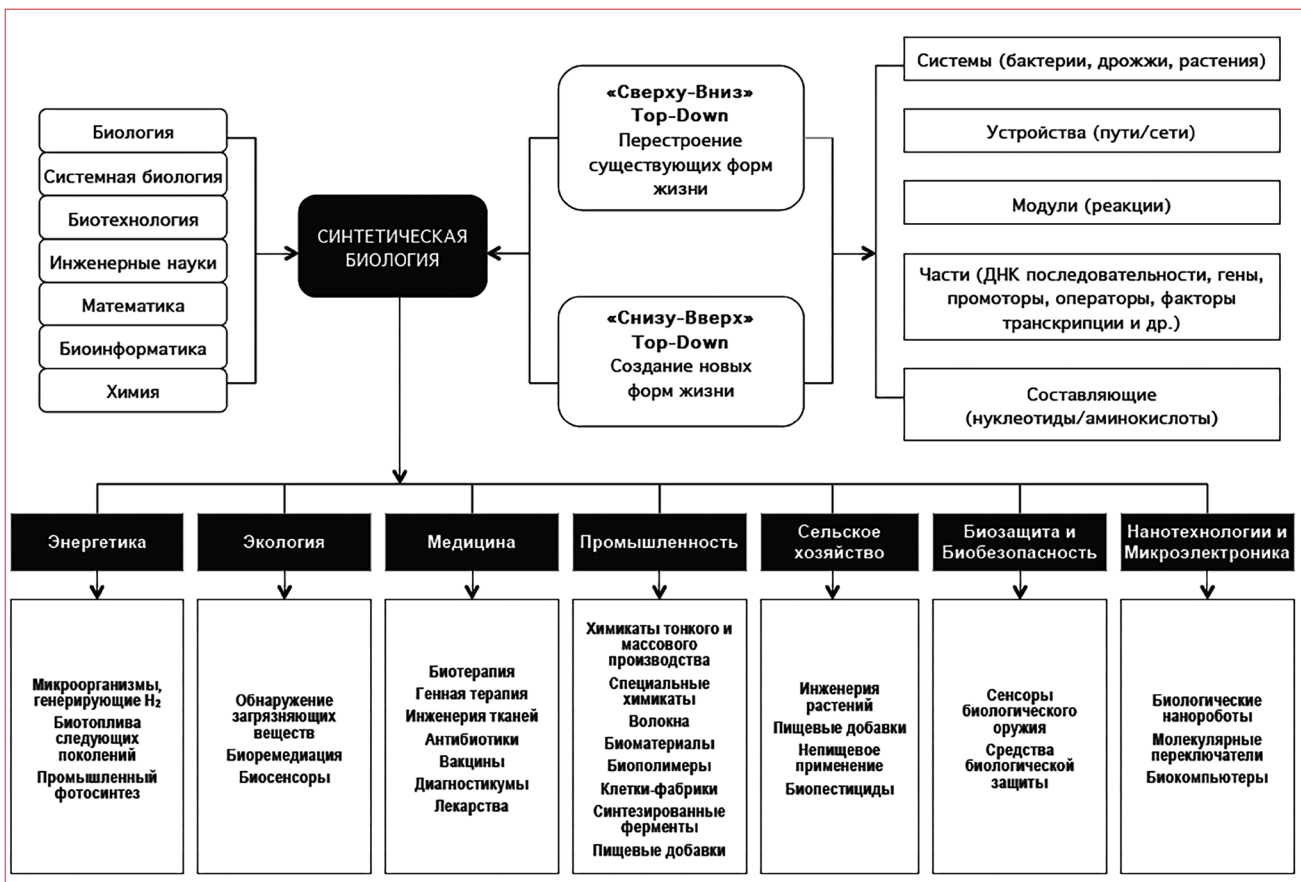


Рис. 1. Пути реализации высокого технологического потенциала синтетической биологии в ответ на современные глобальные вызовы

Свыше 40 стран, осуществляющих активную научно-исследовательскую деятельность в области СБ, формируют базовый ландшафт исследований, который обеспечивается вкладом 508 организаций, в том числе 192 компаний и 204 университетов (данные 2013 г.). Важным фактором ускоренного развития СБ представляется внимание, которое обнаруживается к СБ со стороны бизнеса, а также Министерства обороны США (Defense Department) и его Агентства перспективных исследовательских проектов в области обороны (DARPA), заинтересованных в скорейшем появлении технологий и продуктов, готовых к коммерциализации и широкому применению.

В 2014 г. для проведения углубленных исследований в области СБ в структуре DARPA было создано специальное подразделение — отдел биологических технологий [7]. По данным [30], именно на долю DARPA приходится большая часть средств, выделяемых правительством США на исследования в сфере СБ. В период с 2008 г. по 2014 г. общие инвестиции в исследования по синтетической биологии в США составили 820 млн долларов США, а DARPA только в 2014 г. обеспечило финансирование данного направления на уровне свыше 100 млн долларов США, превысив более чем в три раза подобные расходы Национального научного центра США (National Science Foundation). При этом обращает на себя внимание тот факт, что на исследования угроз и рисков, связанных с данными технологиям, приходится менее 1% от общего объема федерального финансирования и приблизительно столько же — на изучение этических, правовых и социальных аспектов.

В бизнес-сегменте в 2015 г. инвестиции в компании, работающие в области синтетической биологии, составили около 500 млн долларов США, что больше, чем за 2013 г. и 2014 г., вместе взятые [38]. Благодаря большим инвестициям в США, Евросоюзе, Китае, Японии успешно формируется глобальный рынок синтетической биологии, демонстрируя высокие темпы роста. Его показатели выросли с 2,1 млрд долларов США в 2012 г. до 5,54 млрд долларов США в 2020 г. со средним ежегодным приростом 12%. На перспективу ожидаемый рост составит 24,1% [38, 40]. По другим данным, рынок только технологий генетического редактирования в 2017 г. оценивался в 3,19 млрд долларов США и, по прогнозам, достигнет 6,28 млрд долларов США к 2022 г. при среднем показателе роста 14,5%. При этом в 2013–2016 гг. в американские стартапы, занимающиеся редактированием ДНК, было инвестировано более 1 млрд долларов

США, и большая часть этих средств была направлена на развитие CRISPR-технологий.

Препятствовать дальнейшему динамичному развитию рынка могут следующие факторы: высокие расходы на исследования и разработки, строгие нормативы по соблюдению биобезопасности, неопределенность государственно-административной политики в отношении СБ из-за возможных угроз природе и человеку, нерешенность вопросов нормативно-правового регулирования и проблем морально-этического характера, возникающих в связи со всё большим поступлением в оборот продуктов СБ.

Драйверами развития рынка является рост потребности в продуктах СБ в таких сегментах, как защита окружающей среды и энергетика, и прежде всего, — биотоплива следующих поколений. Пандемия COVID-19, охватившая весь мир в 2019–2020 гг. и нанеся огромный ущерб экономике, здоровью и образу жизни людей, на сегменте синтетической биологии отразилась наилучшим образом. Весь арсенал средств противодействия инфекции, — вакцины, диагностические и лекарственные средства — представляют собой область научно-практических интересов синтетической биологии.

На перспективу можно прогнозировать дальнейшее ускорение темпов развития СБ. Такое мнение подкрепляется, помимо прочего, тем фактом, что в 2016 г. было объявлено о запуске международного научного проекта «Human genome project — write» (HGP — write) по «написанию» генома человека. Его цель — создание в течение 10 лет полного синтетического генома человека, по аналогии и как продолжение первого глобального проекта «Human genome project», когда после неполных 13 лет исследований в 2003 г. было объявлено об успешном завершении работ по «прочтению» полного генома человека. В новом проекте, помимо синтеза природных геномов, рассматривается также возможность конструирования синтетических форм жизни с использованием для создания генетического кода неканонических или искусственных нуклеотидов [6].

Угрозы и риски, связанные с развитием технологий синтетической биологии

Угрозы и риски, связанные с развитием СБ, определяются ее современными и перспективными возможностями, несущими в той или иной степени опасность для здоровья и/или жизни людей, биоразнообразия и состояния природной среды. Их можно сгруппировать следующим образом:

- угрозы и риски, возникающие в связи с возможностью использования технологий СБ для создания «постгеномного оружия» нового поколения или в целях биотерроризма;

- угрозы и риски, связанные с непреднамеренным или преднамеренным высвобождением опасных агентов в окружающую среду, включая горизонтальный перенос генов;

- угрозы вследствие неадекватной оценкой рисков и непредсказуемости функционирования сложных биосинтетических систем и организмов;

- угрозы и риски, связанные с созданием альтернативной жизни, возможностью модификаций и трансформаций, направленных на изменение человеческих качеств, как физических, так и психических / психологических / интеллектуальных / ментальных.

Наиболее обсуждаемыми в настоящее время являются первые три группы рисков, имеющих отношение к биобезопасности, биозащите, в то время как четвертая группа, затрагивая широчайший спектр вопросов морально-этического и социогуманитарного характера [37], имеющих прямое отношение к биоэтике, требует отдельного изучения и не рассматривается в рамках настоящего обзора.

Реализация потенциала применения технологий СБ как технологий двойного назначения может привести к значительным человеческим потерям, а также нанести экологический, хозяйственный и экономический ущерб любого масштаба: от регионального — до глобального. Для предотвращения подобных сценариев требуется принятие на государственном уровне комплекса мер по обеспечению биобезопасности и биозащиты, а на международном — международно-правовых актов по контролю и нераспространению [3, 5, 6, 15]. Вопреки этому, в Европе и США на экспертном и политическом уровнях соотношение возможностей опасного раскрытия потенциала этих технологий с существующими мерами безопасности и биологической защиты признается хорошо сбалансированным и практически не оспаривается. Считается, что, поскольку СБ представляет собой продолжение геной инженерии, то на нее распространяется и служит вполне достаточным нормативно-правовое регулирование, сложившееся в сфере генетических исследований и оборота ГМО [24]. В то же время со стороны научного сообщества еще в 1970-е годы в связи с созданием рекомбинантной ДНК высказывалась настолько серьезная обеспокоенность открывающимися перспективами, что это послужило основанием для проведения в 1975 г. первой Асиломарской конференции (Asilomar

conference, США). Инициатором мероприятия оказался Пол Берг (Paul Berg) [1], — создатель первой рекомбинантной ДНК, осознавший опасность своего открытия (к нему присоединились лидеры молекулярной биологии: Джеймс Уотсон, Дэвид Балтимор и др.). Несмотря на поступившие предложения о запрете дальнейших работ с рекомбинантной ДНК, было решено их продолжить в связи с признанием некоторых рисков преувеличенными, однако в ходе конференции были выработаны основные правила биобезопасности при проведении геномных исследований [33]. Несомненной заслугой конференции стало также то, что она положила начало открытости данного направления для публичных дискуссий.

В настоящее время генно-инженерная деятельность, а следовательно, и область СБ, регулируется рядом международных и национальных документов, включая: Международные медико-санитарные правила (2005 г.), Женевский протокол (1925 г.), Конвенцию о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсинного оружия и об их уничтожении (КБТО) (1972 г.), а также Картахенский протокол по биобезопасности (2003 г.) и Нагойский протокол по биобезопасности (2011 г.). Последние два документа являются дополнительными соглашениями к Конвенции Организации Объединенных Наций о биологическом разнообразии (1992 г.), ратифицированной 196 странами мира. Первый из протоколов устанавливает нормативную базу для безопасного перемещения через государственные границы живых модифицированных организмов, а второй — касается проблем доступа и совместного использования преимуществ, обеспечиваемых генетическими ресурсами. Дополнительно странами применяется также регулирование, действующее на национальном уровне [3, 24].

Новые риски, которые возможны по мере развития и усложнения технологий СБ, вряд ли возможно будет полностью урегулировать, опираясь на методы оценки, разработанные для генно-модифицированных организмов. Если текущие разработки в области СБ в основном связаны с использованием хорошо изученного генетического материала охарактеризованных микроорганизмов, для которых доступны соответствующие средства сравнения для оценки потенциальных рисков (компараторы), то на перспективу, когда будут создаваться полностью синтетические организмы, не встречающиеся в природе, таких компараторов не будет. Задумываться об этом и принимать соответствующие меры по разработке специальных методик по оценке рисков применения продуктов СБ необходимо уже сегодня, так как скорость развития

технологий СБ не оставляет времени для затягивания с решением вопросов биобезопасности [30].

Можно предположить, что в европейских странах ситуация постепенно будет меняться. В 2015 г. было опубликовано заключение Научного комитета Европейской комиссии, выработанное 20 экспертами из Европы и США, которые, с одной стороны, сочли сложившуюся систему нормативного регулирования приемлемой для нынешнего уровня манипуляций с природным генетическим материалом, а с другой, — признали, что применение генетических «замков безопасности», которые используются для ГМО и могут быть встроены в продукты синтетической биологии, уже недостаточны в качестве основной стратегии для сдерживания рисков. Комиссией было рекомендовано разработать дополнительные подходы, включая генетические брандмауэры, основанные на неканоническом генетическом материале [16].

Подобно Евросоюзу, в США также отсутствует специальное регулирование для технологий и продуктов СБ и, как прогнозируется [35], маловероятно, что оно появится в ближайшем будущем. Решение обойтись нормативно-правовой базой и законодательными полномочиями, действующими для геной инженерии, было принято в 2010 г., когда Президентская комиссия по биоэтике опубликовала Отчет по синтетической биологии, содержащий рекомендации проводить регулирующий курс «осмотрительной бдительности», представляющий собой нечто среднее между «принципом предосторожности» Европейского Союза (соблюдение всех мер по биобезопасности в отношении продукта СБ до тех пор, пока наука не представит доказательств того, что вред маловероятен) и «проактивным» принципом, возлагающим на государственные структуры бремя доказательств того, что продукт или процесс синтетической биологии небезопасен [28]. Данная рекомендация не имела практического регулирующего воздействия и поэтому не потребовала принятия каких-либо специальных мер.

Неудовлетворенность сложившейся ситуацией со стороны научного сообщества и бизнеса проявилась в 2012 г., когда 117 компаний и организаций одобрили «Принципы надзора за синтетической биологией» (Principles for the Oversight of Synthetic Biology), в которых были изложены желаемые нормативные цели надзора, например, такая: «Никакой синтетический организм или его синтетические строительные блоки не могут быть коммерциализированы или выпущены в окружающую среду без полного раскрытия общественности природы синтетического организма и результатов испытаний на безопасность». Эта цель, как и шесть других,

не была достигнута, и в оборот начали поступать первые продукты, произведенные с использованием методов синтетической биологии [35]. В 2014 г. представители 24 международных организаций по защите окружающей среды, защите прав потребителей и социальной справедливости направили руководству компаний, производящих или готовых производить такую продукцию (компании Method и Ecover), открытое письмо с призывом пересмотреть решение об использовании в своих продуктах ингредиентов, полученных методами синтетической биологии. В письме был сделан акцент на то, что «с учетом значительных пробелов в знаниях преждевременно вводить синтетическую биологию и ее продукты в коммерческое использование. Отсутствуют протоколы для адекватной оценки биобезопасности синтетических микроорганизмов. Существующие меры по оценке риска, контролю и сдерживанию, действующие для генетически модифицированных организмов, могут быть неадекватными для новых организмов, полученных с помощью синтетической биологии. Имеются также серьезные опасения по поводу влияния совершенно новых организмов на биоразнообразие и экосистемы в случае их неконтролируемого высвобождения» [27]. Данное обращение также не нашло отклика ни у производителей, ни у политиков.

В исследовании, подготовленном Национальной академией наук для Министерства обороны США в 2018 г. «Биозащита в век синтетической биологии» (Biodefense in the Age of Synthetic Biology) [16], к сценариям, вызывающим наибольшую обеспокоенность, были отнесены такие технологии СБ, как: конструирование, при наличии данных о генетическом коде, известных вирусов природного происхождения, обладающих высокой патогенностью и скоростью распространения среди целевой популяции; усиление патогенности у природных бактерий; конструирование микроорганизмов, которые могут выживать в кишечнике человека, производя и высвобождая там целевое вещество. К несколько менее опасным отнесены технологии усиления патогенности у природных вирусов и модификации имеющихся метаболических путей у микроорганизмов (бактерии, дрожжи, водоросли) для наработки целевого продукта. К среднему уровню опасности отнесены: внесение изменений в геном человека путем добавления, удаления, модификации генов или эпигенетических изменений, влияющих на экспрессию генов; наработка целевых веществ микроорганизмом за счет создания у него новых биосинтетических метаболических путей; модификация иммунной системы человека для усиления или подавления ответа на опреде-

ленный патоген или стимулирования аутоиммунной реакции; модификация микробиома человека для нарушения его нормальных функций и других целей. Как наименее опасные определены: внесение изменений в геном путем воздействия на конкретные гены или включения определенных генетических фрагментов для распространения в популяции целевых генетических изменений за счет дрейфа генов; конструирование природных высокопатогенных бактерий на основании информации о генетическом коде; создание новых патогенов, в том числе с генетическим материалом от разных организмов. Уровень опасности определяется потенциальной возможностью применения технологии на основании оценки четырех факторов: готовности технологии к применению; возможностью ее использования в качестве оружия (производство и доставка, предсказуемость результатов и т.д.), наличия средств защиты собственного контингента от поражающего воздействия, уровня подготовки персонала к использованию данного вида биологического оружия. Степень опасности проникновения синтетического инфекционного агента в окружающую среду при изготовлении опасного возбудителя индивидуально, частным лицом была оценена как «средняя» или «высокая» с учетом предположения о невозможности в таком случае синтезировать возбудитель в количествах, достаточных для массового поражения [16].

В то же время активная коммерциализация технологий СБ привела к созданию многочисленных технических сервисных компаний, предлагающих услуги по поддержке создания искусственных микроорганизмов. В сети Интернет в свободном доступе можно получить информацию о генетических последовательностях высокопатогенных бактерий и вирусов. Не являются секретом и методы повышения патогенности, вирулентности, скорости передачи опасного возбудителя (например, с помощью геномного редактирования CRISPR-Cas9). Все это обеспечивает высокую доступность технологий синтетической биологии [5, 6]. При наличии достаточного уровня профессиональной подготовки, а также соответствующего оборудования и финансового обеспечения, по мнению [3, 5, 6], вполне возможно из непатогенных микробов получить штаммы особо опасных бактерий или вирусов либо поставить цель создания синтетического вируса-химеры, сочетающего в себе, например, элементы вируса иммунодефицита человека и вируса птичьего гриппа, гепатита или других опасных заболеваний. В результате может быть получен новый, крайне опасный вирус, и его распространение будет иметь необратимые последствия. О реальности подоб-

ных сценариев свидетельствует доклад ЦРУ 2003 г. «Темное будущее биологического оружия» (The Darker Bioweapons Future), из которого следует, что уже тогда были возможны и синтез полноразмерных геномов, и конструирование опасных искусственных вирусов [3]. Очевидно, поэтому сразу после начала пандемии в 2019 г. распространилось и упорно циркулирует мнение об искусственной природе нового, ранее неизвестного вируса. Такое мнение возникло, несмотря на многочисленные опровержения, по следам публикаций в авторитетном журнале «Nature» в ноябре 2015 г. статей с говорящими названиями: Menachery V.D., et al. «A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence» («SARS-подобная группа коронавирусов летучих мышей демонстрирует потенциал к заражению человека») и Butler D. «Engineered bat virus stirs debate over risky research» («Сконструированный вирус летучей мыши вызывает дебаты по поводу рискованного исследования») с подзаголовком «Созданный в лаборатории коронавирус, имеющий отношение к SARS, может инфицировать человеческие клетки». Этот нарратив поддерживается и авторами [6], которые высказывают предположение, что несмотря на отсутствие подобных прецедентов, не исключено, что обнаруженный в Китае коронавирус, вызвавший мировую пандемию, имеет искусственное происхождение и получен в лаборатории с применением достижений синтетической биологии.

Потенциальные риски для экологии и здоровья человека при попадании синтетических организмов в окружающую среду объясняются сложностью искусственных биологических систем, что вызывает большие затруднения в прогнозировании последствий их функционирования [7, 13]. Для обеспечения биобезопасности разрабатываются различные методы контроля и сдерживания распространения синтетических микроорганизмов в природных экосистемах, включая угрозы горизонтального переноса генетического материала, появления устойчивых супербактерий. В частности, высказывается предположение [33], что технологии ксенобиологии, исключающие возможность обмена генетической информацией между синтетическими и природными системами, могут стать фундаментальной основой биобезопасности, обеспечивая генетический брандмауэр путем соблюдения определенных биологических и технических характеристик у создаваемых синтетических конструкций, использования компартиментализованной саморепликации и других подходов. При этом генетический материал, высвобождаемый отмершими синтетическими клетками, также не рас-

познается природной ДНК-полимеразой и не может быть включен в естественные организмы.

Для раннего обнаружения, идентификации и отслеживания синтетической ДНК или организмов в случае их преднамеренного или случайного попадания в окружающую среду используются водяные знаки или штрихкодирование ДНК в виде уникальных синтетических последовательностей, встроенных во множество локусов синтетических геномов. Штрихкод не влияет на фенотип синтетического организма и устойчив к внешним воздействиям; так как у каждой лаборатории имеется свой уникальный штрихкод ДНК, он может быть идентифицирован и восстановлен соответствующими уполномоченными органами [6].

Таким образом, для радикального снижения угроз биобезопасности в связи с быстрыми темпами развития технологий СБ необходима не только разработка подходов и методов, способов и средств защиты в случае биотерроризма, военного применения опасных синтетических агентов или иных угроз. Не менее важным является создание специального законодательного и административно-правового регулирования этой области науки и практики, наряду с формированием надежной государственной системы контроля над распространением синтетических организмов, оценки рисков, мониторинга и оперативного выявления потенциально опасных биоанклавов, предотвращения неконтролируемого использования технологий или проведения несанкционированных исследований в данной области. Применительно к СБ проблемы биобезопасности и правового регулирования, в силу своего глобального характера, не должны ограничиваться национальными границами и нуждаются в дискуссиях и обмене мнениями на уровне международных организаций, мирового научного и экспертного сообщества для предотвращения возможных угроз и злоупотреблений [6].

Более того, можно согласиться с мнением [25], что технологии СБ требуют пересмотра взаимоотношений и взаимодействий человека с природной средой, что, в свою очередь, делает необходимым уже сегодня провести тщательное исследование всего комплекса проблем социальной и биологической безопасности, принятие специальных мер биологической защиты и контроля над распространением, разработку новой методологии оценки рисков для человека и окружающей среды, а также найти ответы на вопросы философского, морально-этического и социогуманитарного характера. Кроме того, развитие СБ выдвигает на передний план также вопросы кадрового

обеспечения, а, соответственно, организации обучения и подготовки высокопрофессиональных биологов-синтетиков [3].

Некоторые аспекты развития синтетической биологии в Российской Федерации

Отечественные научно-технологические заделы в области СБ оцениваются как обладающие низкой конкурентоспособностью [4, 10]. Главной причиной стало недофинансирование научных исследований вследствие общего недостаточного обеспечения развития всей сферы российской биотехнологии. Если, по данным Организации экономического сотрудничества и развития, доля биотехнологических компаний, выполняющих исследования и разработки, составляла в 2016 г. в общем объеме расходов на исследования и разработки в США 12,3%, во Франции — 8,9%, то в Российской Федерации — лишь 0,53%. Как результат, на фоне обширного глобального потока публикаций по направлению геномного редактирования вклад со стороны российских ученых выглядит незначительным и состоит в основном из обзорных статей. Если в США количество ученых, опубликовавших в 2017–2018 гг. научные статьи в этой области, составило более 76 тыс. человек, во Франции — более 22 тыс. человек, то в Российской Федерации — только около 7 тыс. человек [4, 10]. Несмотря на то, что по количеству патентов в области генетических технологий Россия занимает девятое место в мире, в конкретных цифрах это выражается всего в 22 патентах, что свидетельствует об огромном отрыве от лидера — США с 9106 патентами [8].

В качестве основных барьеров для внедрения в Российской Федерации проектов полного жизненного цикла, связанных, в частности, с технологиями геномного редактирования, выделяются, помимо отставания в области научно-технологического развития, следующие: недостаточная кадровая обеспеченность, отсутствие современной отечественной приборной базы, низкая заинтересованность промышленных партнеров в участии в проектах, а также недостаточность нормативно-правового регулирования данной сферы научно-практической деятельности [4].

В геномных исследованиях в 2018 г. в России участвовали около 80 научных организаций и 40 высших учебных заведений, поддерживалось 80 биоресурсных коллекций [8]. Фундаментальные исследования, проводимые в области СБ, финансируются, главным образом, Российским фондом фун-

даментальных исследований (РФФИ) и Российским научным фондом (РНФ). В 2018–2021 гг. РФФИ был организован Конкурс на лучшие научные проекты междисциплинарных фундаментальных исследований по направлению «синтетическая биология», в рамках которого осуществляются экспериментальные и теоретические исследования, направленные на получение фундаментальных научных результатов в соответствии с приоритетами, определенными в Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации до 2035 года [3].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что вплоть до последнего времени наблюдалась явная недооценка масштабов потенциальных возможностей и рисков СБ, а также угроз национальной безопасности, связанных с быстро нарастающим отставанием отечественной науки от мировых лидеров в развитии этого направления. Стоит также отметить, что до настоящего времени в российском научном сообществе, вслед за мировыми тенденциями, прослеживается склонность к определению статуса СБ как нового этапа в развитии геномной инженерии, представляя собой совокупность приемов, методов и технологий, но не науку в широком смысле [3, 7]. Это тормозит формирование национальной нормативно-правовой и административной базы СБ. Как отмечается [9], поскольку в настоящее время геномные технологии могут быть отнесены к сфере генно-инженерной деятельности, на отношения в этой сфере будут распространяться положения ФЗ-86 «О государственном регулировании в сфере генно-инженерной деятельности». При этом понятийный аппарат в законе устарел и не содержит тех объектов правоотношений, которые предусмотрены в Стратегии научно-технологического развития РФ до 2035 года. Исследование роли административно-правового регулирования в развитии геномных технологий в России и за рубежом, выполненное авторами [9], представляет значительный интерес в связи с тем, что именно административное право обеспечивает «баланс между развитием фундаментальной биотехнологии, внедрением эффективных разработок в сфере геномных технологий в различные сектора экономики, с одной стороны, и гарантиями всех видов безопасности, с другой стороны». Заслуживает внимания также разработанная авторами модель административно-правового регулирования генно-инженерной деятельности в России с целью повышения эффективности государственного управления в области геномных технологий.

Как следует из [7], в России существует также очевидная недостаточность средств контроля за соблю-

дением имеющихся норм, а также тот факт, что последние революционные достижения в сфере СБ явно вступают в противоречие с положениями действующих нормативных документов и это требует оперативной разработки для СБ специальной нормативной базы и новых методов контроля.

В 2019–2020 гг. на государственном и правовом уровне наметилась активизация деятельности в сфере поддержки геномных технологий и усиления биобезопасности. Возможно, в связи с пандемией, вызванной новым вирусным штаммом COVID-19, возникло понимание крайне высокой актуальности области геномных и постгеномных исследований, необходимости надежного обеспечения биобезопасности в ответ на современные вызовы. В 2020 г. был принят важный Федеральный закон № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации», в котором зафиксирован комплекс мер, необходимых для защиты населения и природной среды от воздействия опасных биологических факторов, предотвращения биологических угроз и противодействия ненадлежащему использованию опасных биологических агентов. Биологические угрозы определены в законе с учетом текущих и потенциальных возможностей технологий и продуктов СБ. К ним отнесены: изменение свойств и форм патогенов, возможность преодоления патогенами межвидовых барьеров, возникновение и распространение новых инфекций, проектирование и создание патогенов с помощью технологий синтетической биологии, распространение резистентности и др. Законом предусматриваются также меры борьбы с распространением инфекционных и паразитарных болезней, создание и развитие системы мониторинга биологических рисков и государственной информационной системы по обеспечению биологической безопасности, урегулирована деятельность по поддержанию биологических коллекций, связанная с использованием патогенных микроорганизмов и вирусов [11].

С целью реализации Указа Президента Российской Федерации от 28 ноября 2018 г. № 680 «О развитии генетических технологий в Российской Федерации», а также для обеспечения опережающего развития отечественных генетических исследований и соответствующих применительных практик в области медицины, сельского хозяйства, промышленной микробиологии и биобезопасности 22 апреля 2019 г. Правительством Российской Федерации было принято Постановление № 479 «Об утверждении Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы» (далее — Программа). Головной организацией в

реализации Программы, объединившей 7 федеральных органов исполнительной власти, Российской академию наук, вузы и научные организации, определен НИЦ «Курчатовский институт». В рамках Программы предусмотрено финансирование за счет ресурсов шести государственных программ в объеме 111 млрд руб. и привлечения порядка 16 млрд руб. внебюджетных средств. Дополнительно РФ, начиная с 2020 г., будет поддержано до 15 четырехлетних проектов по созданию геномных лабораторий, и на эти цели в 2020–2023 гг. планируется потратить 3 млрд рублей. Ожидается, что к 2027 г., благодаря достигнутым целям Программы, будет разработано 36 генетических технологий для применения в медицине, сельском хозяйстве и промышленности, сформирована национальная система раннего выявления чрезвычайных ситуаций эпидемиологического характера и угроз биологической безопасности, вызванных генетически измененными микроорганизмами и возбудителями опасных инфекций, внедрена система мер обеспечения безопасности применения технологий генетического редактирования, созданы и модернизированы не менее 65 объектов исследовательской инфраструктуры (лаборатории, центры коллективного пользования, биоресурсные коллекции) и др. [10]. В реализации Программы примут участие три геномных центра мирового уровня, созданные на принципах консорциумов в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 30 апреля 2019 года № 538 «О мерах государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня».

Указанные масштабные научные задачи и инфраструктурные преобразования требуют достаточного по численности и уровню профессиональной подготовки кадрового корпуса. И если специалистов в области геномной инженерии готовят давно и повсеместно многочисленные российские вузы, то паспорта научной специальности «синтетическая биология» пока не существует, а подготовка кадров для данного направления ведется по специальностям: молекулярная биология; биохимия; молекулярная генетика; микробиология; биотехнология (в том числе бионанотехнологии); биоинженерия; математическая биология и биоинформатика [3]. Благодаря комплексу принятых мер определенные сдвиги ожидаются и в области кадрового обеспечения СБ. На повышение квалификации и переобучение в рамках Программы планируется выделить 4 млрд руб. и осуществить подготовку и переподготовку 3 тыс. специалистов с использованием, в том числе, и новых образовательных программ [8].

Некоторые особенности зарубежного опыта по кадровому обеспечению синтетической биологии

Большой интерес представляет опыт подготовки специалистов в области СБ, развивающийся в зарубежных странах, особенно в США и Великобритании, где данному направлению уделяется значительное внимание. Несмотря на отсутствие единых универсальных шаблонов в образовательных методиках и программах, можно вычлени четыре базовых принципа обучения будущих синтетических биологов.

Наиважнейшим условием подготовки, во-первых, является получение базовых знаний в определенных дисциплинах, главные из которых: системная биология, генетика, биохимия, биофизика, микробиология, экспериментальные методы исследований, информатика и компьютерное программирование, математическое моделирование, статистические методы научных исследований.

Вторым, не менее важным принципом является привитие умений и навыков, необходимых для проведения междисциплинарных конвергентных исследований. С этой целью, например, в Великобритании созданы Центры подготовки докторантов (Centre for Doctoral Training), где будущие ученые из различных университетов обучаются в течение 4 лет в междисциплинарных группах, работающих над определенной исследовательской задачей в области синтетической биологии. К обучению такому типу исследований относится и популярная практика участия студенческих многопрофильных команд из различных стран мира в международном конкурсе по геномной инженерии iGEM. Конкурс проводится ежегодно в летний период и заключается в том, что командам рассылаются по почте фрагменты ДНК из Банка-реестра стандартных биологических элементов (Registry of Standard Biological Parts), используя которые, они должны конструировать биологические системы с новым генетическим кодом. В открытом доступе сайта iGEM размещены обучающие материалы (включая подкасты, презентации и др.). Команды исследователей также публикуют результаты своих проектов на специальной общедоступной странице.

Третий принцип обучения заключается в формировании у студентов — синтетических биологов ответственного мышления. Опираясь на широкую базу полученных знаний, студенты должны правильно оценивать риски проводимых исследований, уметь определять соотношение между преимуществами создаваемых технологий и продуктов и потенциалом возможных угроз.

Четвертым принципом, который распространяется и на всю сферу СБ в целом, можно считать публичность результатов научных исследований и поощрение дискуссий по проблемам СБ. С этой целью в Великобритании, например, была создана централизованная Интернет-точка доступа для любого человека, интересующегося СБ и желающего получить актуальную информацию и ответы на конкретные вопросы в этой области, а также напрямую участвовать в публичных обсуждениях. Доступ обеспечивается за счет регистрации участия в онлайн-группе по вопросам СБ (SIG). За первые два года ее функционирования количество регистраций участников выросло до уровня свыше 1000 человек, из которых 44% составили представители науки, 28% — промышленности, 7% — государственного сектора. Для учета мнений заинтересованных участников группы на сайте размещена онлайн-анкета по проблемам развития СБ и вопросам биобезопасности. Для развития навыков публичности и умения работать с общественным мнением у студентов, обучающихся по направлению синтетической биологии, проводится обширный общий тренинг по развитию навыков коммуникаций, письма, риторики, чтения литературы по различным дисциплинам и т.д. [18, 22, 26, 36].

Заключение

На основании проведенного обзорного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Синтетическая биология, являясь новым междисциплинарным научным направлением, достигла значительного прогресса как в области фундаментальных научных исследований, так и в сфере разработки и коммерциализации технологий и продуктов.

2. Высокий технологический потенциал СБ обусловлен конвергентным характером научных исследований, обеспечивающим большие возможности по направленному проектированию и конструированию новых биологических систем и синтетических форм жизни как за счет геномного редактирования, так и с использованием неканонических или искусственных нуклеотидов для создания нового генетического кода.

3. Технологии и продукты СБ, обладающие высоким риском потенциального негативного воздействия на человека и природу, относятся к технологиям двойного назначения и могут использоваться в качестве оружия нового поколения или в целях биотерроризма. Любые синтетические агенты представляют вероятную опасность в случае непреднамеренного либо умышленного

высвобождения в окружающую среду в связи с непредсказуемостью их поведения.

4. На международном и национальном уровнях в настоящее время СБ подпадает под нормативно-правовое регулирование, действующее для геномной инженерии. Это вызвано отношением СБ к следующему этапу развития методов геномной инженерии, хотя возможности СБ оперировать не только отдельными генами, но и проводить полногеномные манипуляции, а также проектировать и создавать новые ксеноорганизмы (по принципу «живое из неживого») значительно расширяют предметное поле деятельности СБ, выводя его за рамки геномной инженерии, что делает актуальной задачу развития понятийно-терминологического аппарата для области СБ. Терминологическая неопределенность самого понятия «синтетической биологии» замедляет разработку мер по оценке рисков и обеспечению биобезопасности. Создание единого глоссария в области СБ улучшит взаимодействие между представителями различных научных специальностей, участвующих в междисциплинарных проектах в области СБ, повысит эффективность исследований, обеспечит формирование единой и связанной научной среды.

5. Доступность и реализуемость технологий СБ повышают требования к обеспечению биобезопасности и биозащиты путем принятия на международном и национальном уровнях нормативных актов по контролю и нераспространению технологий и продуктов СБ, представляющих угрозу для человека и природы, и требуют разработки специального законодательства, регулирующего научную и иную деятельность в данной области биологии.

6. Созданию условий, обеспечивающих ускоренное развитие СБ в Российской Федерации, будет способствовать успешная реализация мер государственного и правового регулирования, принятых в последние годы в области биобезопасности, развития геномных исследований и технологий СБ, а также решение задач по созданию отечественной приборно-инструментальной базы и научно-внедренческой инфраструктуры.

7. Важнейшим фактором успешного развития СБ является подготовка специализированных кадров для данной сферы деятельности, в связи с чем при разработке образовательных концепций, методик и программ целесообразно учитывать мировой опыт, накопленный в этой области.

Литература

1. Воробьева О.В., Воробьев В.С. К 80-летию со дня рождения Пола Берга. Завершение молекулярно-био-

- логической гонки эры ДНК // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 4. — С. 69–71.
2. *Грешнова А., Глухов Г., Шайтан А.* Синтетическая биология: конструирование живого // Химия и Жизнь. — 2019. — № 9. URL: https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/434951/Sinteticheskaya_biologiya_konstruirovaniye_zhivogo (дата обращения: 13.05.2021).
 3. *Завриев С., Шемякин И.* Синтетическая биология — современные вызовы и проблемы биобезопасности // Мировая экономика и международные отношения. — 2019. — Т. 63(12). — С. 77–83. doi: 10.20542/0131-2227-2019-63-12-77-83.
 4. *Куракова Н.Г., Петров А.Н., Цветкова Л.А.* Развитие постгеномных технологий в Российской Федерации: барьеры и риски // Менеджер здравоохранения. — 2018. — № 7. — С. 56–67.
 5. *Лентзос Ф.* Потенциал для ненадлежащего использования биологии // Connection QJ. — 2016. — Vol. 15(2). — P. 55–74. doi: 10.11610/Connections.rus.15.2.04.
 6. *Мохов А.А., Чапленко А.А., Яворский А.Н.* Достижения синтетической биологии и регуляторная политика государства // Ремедиум. — 2020. — № 4–5–6. — С. 79–86. doi: 10.21518/1561-5936-2020-4-5-6-79-86.
 7. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Одинокоев Г.Н., Сафронов В.А.* Синтетическая биология: риски и перспективы // Проблемы особо опасных инфекций. — 2014. — Вып. 3. — С. 5–10.
 8. О роли центров геномных исследований мирового уровня в развитии генетических технологий в России. — 12 ноября 2019. URL: <http://government.ru/news/38316/> (дата обращения: 26.05.2021).
 9. *Петушкова Ю.А., Каменский П.А.* Роль административно-правового регулирования в развитии геномных технологий на примере России и зарубежных стран // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16. — № 3. — С. 43–51.
 10. Постановление Правительства Российской Федерации от 22 апреля 2019 г. № 479 «Об утверждении Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы». URL: <http://static.government.ru/media/files/1FErVexYSovVFduUn1tStWlLkqrkTEmu.pdf> (дата обращения: 26.05.2021).
 11. Федеральный закон № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации», утвержден Президентом Российской Федерации 30 декабря 2020 г. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/400056868/> (дата обращения: 26.05.2021).
 12. *Шваб К.* 4-ая промышленная революция. — «Эксмо», 2016. — С. 11–12.
 13. Этические аспекты синтетической биологии. Протоколы дискуссии за «Круглым столом». Европейская группа по этике в науке и новых технологиях / Юдин Б.Г. — Люксембург: Издательство официальных публикаций Европейского Союза, 2008. — 84 с. doi: 10.2775/34131.
 14. *Anderson J., Strelkowa N., Stan G.-B., Douglas T., Savulescu J., Barahona M., Papachristodoulou A.* The engineering and ethics of synthetic biology. — Nature Publishing Group on behalf of European Molecular Biology Organization, 2012. — 7 p. doi: 10.1038/embor.2012.81.
 15. *Avecado-Rocha C.G.* *The Synthetic Nature of Biology / In: Hagen K., et al.* Ambivalences of Creating Life. Societal and Philosophical Demensions of Synthetic Biology. — Springer, 2016. — 53 p. doi: 10.1007/978-3-319-21088-9_2.
 16. Biodefense in the Age of Synthetic Biology. National Academy of Sciences, Engineering and Medicine. Washington DC, The National Academic Press. — 2018. — 188 p. doi: 10.17226/24890.
 17. *Breitling R., Takano E., Gardner N.S.* Judging Synthetic Biology Risks // Science. — 2015. — Vol. 347(6218). — P. 107. doi: 10.1126/science.aaa5253.
 18. *Clark L.J., Kitney L.I.* Synthetic biology in the UK — An outline of plans and progress // Syst. Synth. Biol. — 2016. — No. 1 — P. 243–257. doi: 10.1016/j.synbio.2016.09.003.
 19. Does Full Genome Sequencing Really Cost \$1,000 Now? URL: <https://www.nanalyze.com/2016/03/does-full-genome-sequencing-really-cost-1000-now/> (дата обращения: 18.05.2021).
 20. *Douglas T., Savulescu J.* Synthetic biology and the ethics of knowledge // J. Med. Ethics. — 2010. — No. 36. — P. 687–693. doi: 10.1136/jme.2010.038232.
 21. *Galdzicki M., Rodriguez C., Chandran D., Sauro H. M., Gen J.H.* Standard Biological Parts Knowledgebase // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6(2). — e17005. doi: 10.1371/journal.pone.0017005.
 22. Global Perspectives in Convergence Education / Workshop Report. November 2–3, 2017, Washington DC. Report located at: <http://www.nsf.gov/nano/ConvergenceEducation>
 23. *Hutchison C.A. III et al.* Design and synthesis of a minimal bacterial genome // Science. — 2016. — Vol. 351(6580). — P. 1414–1421. doi: 10.1126/science.aad6253.
 24. *Kelper F., Atanassova A.* Regulation on Synthetic Biology: Development Under the Convention on Biological Diversity and its protocols // Front. Bioeng. Biotechnol. — 2020. — Vol. 8(310). — 20 p. doi: 10.3389/fbioe.2020.00310.
 25. *Kuldell N., Bernstein R., Ingram K., Hart K.M.* BioBuilder. — BioBuilder Educational Foundation. — USA: O'Reilly Media, Inc., 2015. — 10 p.
 26. *Kuldell N.* Authentic teaching and learning through synthetic biology // Journal of Biological Engineering. — USA: BioMed Central Ltd., 2007. — 6 p. doi: 10.1186/1754-1611-1-8.

27. Open letter to Ecover/Method. — June 2, 2014. URL: <http://www.etcgroup.org/content/open-letter-ecover-method> (дата обращения: 17.05.2021).
28. Opinion on Synthetic Biology I (Definition), Scientific Committee on Health and Environmental Risks. — European Union, 2014. — 67 p. doi: 10.2772/76553.
29. Owens J. U.S. Trends in Synthetic Biology Research Funding, 2020. URL: <https://www.synbioproject.org/publications/u.s-trends-in-synthetic-biology-research-funding/> (дата обращения: 02.05.2021).
30. Pauwels K., Willemarck N.A.J., Herman P. Synthetic Biology. Latest developments, biosafety considerations and regulatory challenges. — ISPWIV, Biosafety and Biotechnology Unit, Brussels, Belgium, 2012. — 43 p.
31. Peccoud J., Blauvelt M. F., Cai Y, Cooper K. L., Crasta O., DeLalla E. C., Evans C., Folkerts O., Lyons B. M., Mane S.P., Shelton R., Sweede M.A., Waldon S.A. Targeted development of registries of biological parts // PLoS ONE. — 2008. — Vol. 3(7). — e2671. doi: 10.1371/journal.pone.0002671.
32. Schmidt M., Ganguli-Mitra A., Torgersen H., Kelle A., Deplazes A., Biller-Andorno N. A priority paper for the societal and ethical aspects of synthetic biology // Syst. Synth. Biol. — 2009. — No. 3. — P. 3–7. doi: 10.1007/s11693-009-9034-7.
33. Schmidt M. Xenobiology: A new form of life as the ultimate biosafety tool // BioEssay, Wiley Periodicals, Inc. — 2010. — Vol. 32. — P. 322–331. doi: 10.1002/bies.200900147.
34. Seo S.W., Yang J., Min B.E., Jang S., Lim J.H., Lim H.G., Kim S.C., Kim S.Y., Jeong J.H., Jung G.Y. Synthetic Regulatory Tools to Engineer Microbial Cell Factories for Chemical Production / In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Sudhir P. Singh et al., Eds. — Elsevier B.V., 2019. — P. 115–141. doi: 10.1016/B978-0-444-6485-7.00005-8.
35. Suppen S. From GMO to SMO: How Synthetic Biology evades regulation / Institute for Agriculture and Trade Policy, USA. — 2014. — 5 p.
36. SynBio CDT. Student HandBook. — EPSRC & BBSRC Synthetic Biology Centre for Doctoral Training. — 2015. — 78 p.
37. Synthetic Biology, Social and Ethical Challenges. Institute for Science and Society / Balmer A., Martin P. — Nottingham: University of Nottingham, 2008. — 36 p.
38. Synthetic biology — Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, 2015. — Technical Series No. 82. — 118 p.
39. Synthetic Biology: scope, applications and implications. — The Royal Academy of Engineering. — London, 2009. — 61 p.
40. Synthetic Biology Market. — Market Data Forecast. URL: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/synthetic-biology-market> (дата обращения: 21.05.2021).
41. Synthetic biology raises risk of new bioweapons, US report warns. — The Guardian, 2018. URL: <https://www.theguardian.com/science/2018/jun/19/urgent-need-to-prepare-for-manmade-virus-attacks-says-us-government-report> (дата обращения: 18.05.2021).

References

1. Vorob'yeva OV, Vorob'yev VS. K 80-letiyu so dnya rozhdeniya Pola Berga. Zaversheniye molekulyarno-biologicheskoy gonki ery DNK. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. YuA Ovchinnikova 2006; 2(4):69–71 (in Russian).
2. Greshnova A, Glukhov G, Shaytan A. Sinteticheskaya biologiya: konstruirovaniye zhivogo. Khimiya i Zhizn' 2019; 9. URL: https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/434951/Sinteticheskaya_biologiya_konstruirovaniye_zhivogo (data obrashcheniya: 13.05.2021) (in Russian).
3. Zavriyev S, Shemyakin I. Sinteticheskaya biologiya — sovremennyye vyzovy i problemy biobezopasnosti. Mirovaya ekonomika i mezhdunarodnyye otnosheniya 2019; 63(12):77–83. doi: 10.20542/0131-2227-2019-63-12-77-83 (in Russian).
4. Kurakova NG, Petrov AN, Tsvetkova LA. Razvitiye postgenomnykh tekhnologiy v Rossiyskoy Federatsii: bar'yery i riski. Menedzher zdavookhraneniya 2018; 7:56–67 (in Russian).
5. Lentzos F. Potentsial dlya nenadlezhashchego ispol'zovaniya biologii. Connection QJ 2016; 15(2):55–74. doi: 10.11610/Connections.rus.15.2.04 (in Russian).
6. Mokhov AA, Chaplenko AA, Yavorskiy AN. Dostizheniya sinteticheskoy biologii i regul'yatornaya politika gosudarstva. Remedium 2020; 4–5–6: 79–86. doi: 10.21518/1561-5936-2020-4-5-6-79-86 (in Russian).
7. Onishchenko GG, Kutyrev VV, Odinokov GN, Safronov VA. Sinteticheskaya biologiya: riski i perspektivy. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2014; 3:5–10 (in Russian).
8. O roli tsentrov genomnykh issledovaniy mirovogo urovnya v razvitiu geneticheskikh tekhnologiy v Rossii. — 12 noyabrya 2019. URL: <http://government.ru/news/38316/> (data obrashcheniya: 26.05.2021) (in Russian).
9. Petushkova YuA, Kamenskiy PA. Rol' administrativno-pravovogo regulirovaniya v razvitiu genomnykh tekhnologiy na primere Rossii i zarubezhnykh stran. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA. Ovchinnikova 2020; 16. 3:43–51 (in Russian).
10. Postanovleniye Pravitel'stva Rossiyskoy Federatsii ot 22 aprelya 2019 g. № 479 «Ob utverzhdenii Federal'noy nauchno-tekhnicheskoy programmy razvitiya geneticheskikh tekhnologiy na 2019–2027 gody». URL: <http://static.government.ru/media/files/1FErVexYS0VYFduUn1tStWILkyrkTEmu.pdf> (data obrashcheniya: 26.05.2021) (in Russian).
11. Federal'nyy zakon № 492-FZ «O biologicheskoy bezopasnosti v Rossiyskoy Federatsii», utverzhden Prezidentom

- Rossiyskoy Federatsii 30 dekabrya 2020 g. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/400056868/> (data obrashcheniya: 26.05.2021) (in Russian).
12. Shvab K. 4-aya promyshlennaya revolyutsiya. «Eksmo», 2016: 11–12 (in Russian).
 13. Eticheskiye aspekty sinteticheskoy biologii. Protokoly diskussii za «Kruglym stolom». Yevropeyskaya gruppa po etike v nauke i novykh tekhnologiyakh. Yudin BG. Lyuksemburg: Izdatel'stvo ofitsial'nykh pubdikatsiy Yevropeyskogo Soyuzha, 2008: 84. doi: 10.2775/34131 (in Russian).
 14. Anderson J, Strelkova N, Stan G-B, Douglas T, Savulescu J, Barahona M, Papachristodoulou A. The engineering and ethics of synthetic biology. Nature Publishing Group on behalf of European Molecular Biology Organization, 2012: 7. doi: 10.1038/embor.2012.81.
 15. Avecado-Rocha CG The Synthetic Nature of Biology / In: Hagen K, et al. Ambivalences of Creating Life. Societal and Philosophical Demensions of Synthetic Biology. Springer, 2016: 53. doi: 10.1007/978-3-319-21088-9_2.
 16. Biodefense in the Age of Synthetic Biology. National Academy of Sciences, Engineering and Medicine. Washington DC, The National Academic Press 2018: 188. doi: 10.17226/24890.
 17. Breitling R, Takano E, Gardner NS. Judging Synthetic Biology Risks. Science 2015; 347(6218):107. doi: 10.1126/science.aaa5253.
 18. Clark LJ, Kitney LI. Synthetic biology in the UK – An outline of plans and progress. Syst Synth Biol 2016;1:243–257. doi: 10.1016/j.synbio.2016.09.003.
 19. Does Full Genome Sequencing Really Cost \$1,000 Now? URL: <https://www.nanalyze.com/2016/03/does-full-genome-sequencing-really-cost-1000-now/> (date of access: 18.05.2021).
 20. Douglas T, Savulescu J. Synthetic biology and the ethics of knowledge. J Med Ethics 2010; (36):687–693. doi: 10.1136/jme.2010.038232.
 21. Galdzicki M, Rodriguez C, Chandran D, Sauro H M, Gen JH. Standard Biological Parts Knowledgebase. PLoS ONE 2011; 6(2):e17005. doi: 10.1371/journal.pone.0017005.
 22. Global Perspectives in Convergence Education / Workshop Report. November 2–3, 2017, Washington DC. Report located at: <http://www.nsf.gov/nano/ConvergenceEducation>
 23. Hutchison CA III et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. Science 2016; 351(6580):1414–1421. doi: 10.1126/science.aad6253.
 24. Kelper F, Atanassova A. Regulation on Synthetic Biology: Development Under the Convention on Biological Diversity and its protocols. Front. Bioeng. Biotechnol 2020; 8(310): 20. doi: 10.3389/fbioe.2020.00310.
 25. Kuldell N, Bernstein R, Ingram K, Hart KM. BioBuilder. – BioBuilder Educational Foundation. USA: O'Reilly Media, Inc., 2015: 10.
 26. Kuldell N. Authentic teaching and learning through synthetic biology. Journal of Biological Engineering. USA: BioMed Central Ltd., 2007: 6. doi: 10.1186/1754-1611-1-8.
 27. Open letter to Ecover/Method. June 2, 2014. URL: <http://www.etcgroup.org/content/open-letter-ecover-method> (дата обращения: 17.05.2021).
 28. Opinion on Synthetic Biology I (Definition), Scientific Committee on Health and Environmental Risks. European Union, 2014: 67. doi: 10.2772/76553.
 29. Owens J. US Trends in Synthetic Biology Research Funding, 2020. URL: <https://www.synbioproject.org/publications/u.s-trends-in-synthetic-biology-research-funding/> (дата обращения: 02.05.2021).
 30. Pauwels K, Willemarck NAJ, Herman P. Synthetic Biology. Latest developments, biosafety considerations and regulatory challenges. ISPWIV, Biosafety and Biotechnology Unit, Brussels, Belgium, 2012: 43.
 31. Peccoud J, Blauvelt M F, Cai Y, Cooper K L, Crasta O, DeLalla E C, Evans C, Folkerts O, Lyons B M, Mane SP, Shelton R, Sweede MA, Waldon SA. Targeted development of registries of biological parts. PLoS ONE 2008; 3(7):e2671. doi: 10.1371/journal.pone.0002671.
 32. Schmidt M, Ganguli-Mitra A, Torgersen H, Kelle A, Deplazes A, Biller-Andorno N. A priority paper for the societal and ethical aspects of synthetic biology. Syst Synth Biol 2009;(3):3–7. doi: 10.1007/s11693-009-9034-7.
 33. Schmidt M. Xenobiology: A new form of life as the ultimate biosafety tool. BioEssay, Wiley Periodicals, Inc 2010; 32:322–331. doi: 10.1002/bies.200900147.
 34. Seo SW, Yang J, Min BE, Jang S, Lim JH, Lim HG, Kim SC, Kim SY, Jeong JH, Jung GY. Synthetic Regulatory Tools to Engineer Microbial Cell Factories for Chemical Production. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Sudhir P Singh et al, Eds. Elsevier BV, 2019:115–141. doi: 10.1016/B978-0-444-6485-7.00005-8.
 35. Suppen S. From GMO to SMO: How Synthetic Biology evades regulation. Institute for Agriculture and Trade Policy, USA 2014: 5.
 36. SynBio CDT. Student HandBook. – EPSRC & BBSRC Synthetic Biology Centre for Doctoral Training 2015; – 78 p.
 37. Synthetic Biology, Social and Ethical Challenges. Institute for Science and Society. Balmer A, Martin P. Nottingham: University of Nottingham, 2008: 36.
 38. Synthetic biology. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, 2015. – Technical Series No. 82. – 118 p.
 39. Synthetic Biology: scope, applications and implications. The Royal Academy of Engineering. London, 2009: 61.
 40. Synthetic Biology Market. Market Data Forecast. URL: <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/synthetic-biology-market> (date of access: 21.05.2021).
 41. Synthetic biology raises risk of new bioweapons, US report warns. The Guardian, 2018. URL: <https://www.theguardian.com/science/2018/jun/19/urgent-need-to-prepare-for-manmade-virus-attacks-says-us-government-report> (дата обращения: 18.05.2021).

FEATURES OF SYNTHETIC BIOLOGY AS A NEW INTERDISCIPLINARY FIELD OF CONVERGENT RESEARCHES WITH HIGH TECHNOLOGICAL POTENTIAL

K.G. GAEV¹, T.N. GAEVA², R.G. VASILOV²

¹ *Moscow International School,*

² *National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow*

The review traces the formation of synthetic biology as a new scientific direction with high technological potential and a dichotomy of possibilities, on the one hand, creative, and on the other, carrying risks and threats to human health and the state of the natural environment. An attempt is made to identify the relationship between the lack of a generally recognized interpretation of the term «synthetic biology» and the lack of formation at the international and national levels of direct legal regulation of the relevant area, designed to control risks, contain and prevent threats to biosafety. The features of synthetic biology, expanding the boundaries of its subject area beyond the limits of genetic engineering, are shown. Some aspects of the development of synthetic biology in the Russian Federation are analyzed. Special attention is paid to the topical issue of training personnel for a new interdisciplinary area of convergent research.

Keywords: interdisciplinary convergent researches, synthetic biology, genetic engineering, biological engineering, genome editing, xenobiology, synthetic genome, minimal genome, factory cells, biosecurity, biosafety, dual-use technologies, post-genomic weapons.

Address:

Gaev K.G.

11th grade student of the Moscow International School

E-mail: gaevklim@gmail.com

Для цитирования:

Гаев К.Г., Гаева Т.Н., Василов Р.Г. Особенности синтетической биологии как новой междисциплинарной области конвергентных исследований с высоким технологическим потенциалом. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(2):75–91.

For citation:

Gaev K.G., Gaeva T.N., Vasilov R.G. Features of synthetic biology as a new interdisciplinary field of convergent researches with high technological potential. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(2):75–91 (in Russian).

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2021 ГОДА

**К 100-летию со дня рождения академика
АМН СССР и РАМН И.Н. Блохиной
(1921–1999)***



В апреле 2021 года исполнилось 100 лет со дня рождения крупного отечественного микробиолога Блохиной Ирины Николаевны.

Она родилась 21 апреля 1921 года в Нижнем Новгороде в семье земского врача. Вместе со своим братом Николаем Николаевичем, будущим выдающимся онкологом, президентом АМН СССР, поддержала семейные традиции, только предпочла микробиологию.

По окончании в 1942 г. медицинского института (тогда он именовался Горьковским) она начала трудиться в местном НИИ эпидемиологии и микробиологии. Здесь, по ее мнению, она получила полную возможность для приобщения и совершенствования в избранной научной отрасли, чему в немалой степени способствовали ее учителя Ф.Т. Гринбаум и К.И. Сучкова. В начале своей научной деятельности она целенаправленно изучала проблему изменчивости бактерий. Результаты были оформлены в виде кандидатской диссертации на тему «Изменчивость бактерий брюшного тифа в воде» (1953).

Такой успешный старт в науке во многом предопределил судьбу Ирины Николаевны как инициативного исследователя и созидательной, творческой личности. В начале 1950-х годов ею была основана лаборатория физиологии и биохимии бактерий, к ра-

боте в которой была привлечена научная молодежь, нацеленная на изучение фундаментальных особенностей метаболизма микробов (главным образом энтеробактерий). Относительно быстро было сформировано оригинальное направление в сфере сравнительно-физиологического изучения микроорганизмов с использованием методов числовой таксономии, компьютерного анализа и подходов к исследованию наследственного материала. Итоги данного цикла работ были обобщены ею в докторской диссертации «Некоторые особенности брожения и дыхания бактерий как дифференциальные и производственные тесты» (1966).

Больше того, И.Н. Блохина сумела найти организационные механизмы для внедрения новейших методов молекулярной биологии в практику микробиологических работ благодаря установлению контактов с вице-президентом АН СССР А.Н. Белозерским, что подняло на новый качественный уровень деятельность руководимого ею коллектива. При этом она предприняла конкретные шаги, создав в своем институте первую в стране лабораторию геносистематики бактерий. Она всегда видела точки роста в своей и смежных областях. Например, только набирал силу в 1980-е годы в науке метод ПЦР, а она уже настоятельно пропагандировала его среди учеников и коллег.

Есть в научном поиске отдельных талантливых ученых «искра божия», интуитивное чутье к первопроедческому пути. В этом отношении Ирине Николаевне повезло, особенно с бактериофагами. На базе тщательного изучения указанной проблемы она сформулировала основополагающие представления о микробиоценозах кишечника человека и дала соответствующие рекомендации по фагам с учетом региональной специфики.

Наконец, выход на решение практических проблем, а именно: создание ряда ценных, востребованных иммунобиологических препаратов: внутривенный иммуноглобулин для детей, лактобактерин, эколакт и др. Излишне говорить о постоянном мониторинге ее институтом эпидситуации в Нижегородском регионе и стране, участии в ликвидации вспышек холеры в СССР.

Целесообразно перечислить еще ряд тем, которые исследовались под руководством И.Н. Блохиной. Речь идет о работах кафедры молекулярной биологии и иммунологии Горьковского (Нижегородского) государственного университета имени Н.И. Лобачевского, которой также заведовала Ирина Николаевна (с 1976 по 1989 гг.), в том числе и о темах, выполненных в рам-

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым.

ках сотрудничества кафедры с НИИ эпидемиологии и микробиологии. К ним относятся такие направления:

- определение состава циркулирующих видов микробактерий в Волго-Вятском регионе;
- изучение природных резервуаров этиологически значимых энтеробактерий;
- исследование биоразнообразия микробных штаммов почв Нижегородской области;
- поиск новых бактерицидных и иммуностропных, иммуномодулирующих препаратов;
- анализ полиморфизма микроорганизмов в связи с плазмидной устойчивостью к антибиотикам;
- проведение биоэкологического и биомедицинского мониторинга микробных популяций на промышленных площадках г. Кстово.

И еще один факт, закономерно следующий из 44-летнего директорства И.Н. Блохиной в НИИ эпидемиологии и микробиологии. За это время было сформировано несколько поколений квалифицированных специалистов, преданных своему делу, без тени комплекса ложности положения, что во многом объясняется личным примером, безукоризненной научной сосредоточенностью и целеустремленностью руководителя. В такой

обстановке членам коллектива нельзя было имитировать реальный труд и подменять его поверхностной или околонушной деятельностью

В целом перед нами проходит большая, красивая жизнь человека на своем месте, любящего свое дело и свое отечество. Ясно, что общественное признание сопутствовало ей всегда, особенно при ее безотказном, отзывчивом, истинно русском характере. В 1970–1980-е годы И.Н. Блохина являлась председателем комиссии Верховного Совета СССР по здравоохранению и социальному обеспечению, в течение 20 лет входила в состав Комитета советских женщин. В 1992–1999 гг. возглавляла Нижегородское отделение Российского фонда «Здоровье человека». Она — лауреат Государственной премии СССР. В 1996 году ее удостоили звания «Почетный гражданин Нижнего Новгорода». Имеет государственные награды.

Земляки помнят и чтут ее: одну из улиц родного города назвали ее именем. Посмертно имя Ирины Николаевны Блохиной присвоено Нижегородскому научно-исследовательскому институту эпидемиологии и микробиологии. Светлую память о ней хранят и многие близко знавшие ее.

**К итогам XXXIII зимней международной
молодежной научной школы «Перспективные
направления физико-химической биологии
и биотехнологии»***

В феврале 2021 г. в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН состоялась ежегодная зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Инициатором проведения Школы выступил Учебно-научный центр ИБХ РАН, соорганизаторами — Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова и Физтех-школа медицинской и биологической физики МФТИ, официальным спонсором — компания Хеликон.

В связи с пандемией COVID-19 Оргкомитетом было принято решение провести Школу в онлайн-формате. В рамках Школы-2021 был проведен конкурс работ молодых ученых. Научные сотрудники из различных подразделений ИБХ РАН, а также члены Совета молодых ученых ИБХ РАН приняли активное участие в экспертизе представленных проектов. Особую благодарность хотелось бы выразить всем экспертам, обеспечившим объективное и доброжелательное рецензирование работ конкурсантов.

К молодым участникам школы обратился научный руководитель ИБХ РАН, сопредседатель Программного комитета Школы-2021 академик В.Т. Иванов, который подчеркнул традиционность мероприятия и пожелал творческих успехов.

Обладателем первой премии в номинации «Студенты» стал студент 3 курса Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, представитель НИЦ «Курчатовский институт» — Институт молекулярной генетики (Москва) Владимир Пантелеев. Его работа «Изучение биохимических характеристик прокариотического белка семейства аргонатов».

1-е место в номинации «Аспиранты» получила аспирантка ИБХ РАН и представляющая также НИИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева (Москва) Валерия Украинская за работу «Изучение влияния искусственных антиген-презентирующих везикул на противоопухолевую активность CAR-T клеток».

В номинации «Молодые научные сотрудники» лучшей была признана работа Виктории Шипуновой из ИБХ РАН, МФТИ (НИУ), НИЯУ «МИФИ» (Москва) «Гибридные наноструктуры для онкотерапии».

Среди победителей в своих номинациях 2-е места заняли: Баймуханова Ж.Ж. (ФГБУ Федеральный НКЦ физико-химической медицины ФМБА); Белова М.М. (ИБХ РАН, МФТИ (НИУ), НИЯУ «МИФИ»); Басс Д.Ю. (ИБХ РАН); Лубова К.И. (ИБХ РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России); Алексеева А.С. (ИБХ РАН); Максимова В.П. (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России, ФГБОУ ВО Московский политехнический университет).

Соответственно 3-е места заняли: Заиграев М.М. (МФТИ (НИУ), ИБХ РАН); Кочаровская М.В. (ИБХ РАН, МФТИ (НИУ)); Мамонтова Е.Д. (МГУ, НИИЦ кардиологии МЗ РФ, НИИЦ эндокринологии МЗ РФ); Ишина И.А. (ИБХ РАН); Чащина Г.В. (ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН), МФТИ (НИУ); Петренко Д.Е. (НИЦ «Курчатовский институт», Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, ИБХ РАН); Балацкий А.В. (МГУ им. М.В. Ломоносова); Зелепукин И.В. (ИБХ РАН, МФТИ (НИУ), НИЯУ «МИФИ»); Сай А.В. (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗ Москвы, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России).

В число призеров конкурса вошел еще 21 человек — молодые исследователи из разных учреждений (полный список см. на нижеуказанном сайте).

Победителям и призерам Конкурса работы молодых ученых были вручены памятные дипломы.

В своем заключительном слове директор ИБХ РАН, сопредседатель Программного комитета академик А.Г. Габитов поблагодарил сопредседателей Программного и Организационного комитетов, пленарных докладчиков и молодых ученых за участие в работе Школы и выразил надежду на то, что следующая школа пройдет в традиционном формате по окончании пандемии.

С полным списком победителей и призеров конкурса, программой Школы-2021, сборником тезисов и видеозаписями стендовых сообщений можно ознакомиться на сайте sec-ibch.ru.

* Материал подготовлен Т.В. Овчинниковой, руководителем Учебно-научного центра ИБХ РАН, председателем Оргкомитета

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 29.06.2021
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,0. Тираж 1000 экз.

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