

**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

2021, Vol. 17, No 3

**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

ISSN 1996-4741

© Information and Analytical Center  
for Medical and Social Problems, 2021

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Василев* ..... 5

**Оригинальные статьи**

- Биотрансформация пищевой фракции бытовых отходов мицелиальными грибами *Aspergillus oryzae* в удобрение для сельскохозяйственных культур.  
*А.А. Мижева, Л.А. Иванова* ..... 6
- Изучение антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли, обработанной импульсным магнитным полем, в отношении бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.  
*Т.И. Васильева, Н.А. Роденко, А.К. Мадьярова, И.А. Беляева* ..... 12
- Характеристика элементов структуры урожайности генотипов чечевицы статистическими методами (*Lens culinaris* Medik.).  
*М.Э. Мамедова* ..... 17
- Влияние углеводной диеты на кишечную микрофлору крыс в состоянии дисбиоза.  
*Е.В. Скворцов, Рин.С. Мухаммадиев, Рин.С. Мухаммадиев, Л.Р. Валиуллин, Ю.М. Тремасов, А.М. Тремасова* ..... 24
- Разработка технологии выделения имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*.  
*И.А. Красовицкая, Н.В. Котова, А.В. Гусев* ..... 31
- Оценка качества готовой пищевой продукции по микробиологическим показателям.  
*И.И. Кошкарева, Л.В. Катаева, Т.Ф. Степанова* ..... 37

**Обзоры**

- Возможный механизм взаимодействия бактериоцинов с чувствительными клетками бактерий.  
*Э.А. Светоч, В.И. Суровцев, В.М. Борзенков* ..... 42
- Фотоэлектрические ячейки на основе Фотосистемы II для продукции водорода.  
*И.А. Доронин, Т.Н. Гаева, С.И. Аллахвердиев, Р.Г. Василев* ..... 46
- Аспекты конструирования экспериментальных профилактических препаратов на основе холерных бактериофагов.  
*А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко* ..... 60
- Модели клеточных линий и возможности их использования при изучении свойств холерных вибрионов.  
*О.Ф. Кретенчук, В.А. Коршенко, И.А. Щипелева* ..... 69

**Правила для авторов** ..... 79

**CONTENTS**

**Column of the editor-in-chief**

To readers. *R.G. Vasilov* ..... 5

**Original articles**

Biotransformation of the food fraction of household waste by means of mycelial mushrooms *Aspergillus oryzae* into the fertilizer for agricultural crops.

*A.A. Mizheva, L.A. Ivanova* ..... 6

Study of the antibacterial activity of benzylpenicillin sodium salt, treated with a pulsed magnetic field, against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

*T.I. Vasilieva, N.A. Rodenko, A.K. Madyarova, I.A. Belyaeva* ..... 12

Characteristic of the elements of the yield structure of lentil genotypes by statistical methods (*Lens culinaris* Medik.).

*M.E. Mamedova* ..... 17

Influence of carbohydrate diet on intestinal microflora in rats in the state of dysbiosis.

*E.V. Skvortsov, Rish. S. Mukhammadiev, Rin. S. Mukhammadiev, L.R. Valiullin, Yu.M. Tremasov, A.M. Tremasova* ..... 24

Development of a technology for isolation of imbricin from cultural liquid *Streptomyces imbricatus*.

*I.A. Krasovitskaya, N.V. Kotova, A.V. Gusev* ..... 31

Evaluation of the quality of finished food products by microbiological indicators.

*I.I. Koshkareva, L.V. Kataeva, T.F. Stepanova* ..... 37

**Reviews**

Possible mechanism of interaction of bacteriocins with sensitive bacterial cells.

*E.A. Svetoch, V.I. Surovtsev, V.M. Borzenkov* ..... 42

Photoelectric cells based on Photosystem II for hydrogen production.

*I.A. Doronin, T.N. Gaeva, S.I. Allakhverdiev, R.G. Vasilov* ..... 46

Design aspects of the experimental preventive preparations based on cholera bacteriophages.

*A.V. Tyurina, N.E. Gaevsкая, M.P. Pogozhova, A.O. Anoprienko* ..... 60

Models of cell lines and the possibility of their use in the study of the properties of *Vibrio cholerae*.

*O.F. Kretenchuk, V.A. Korshenko, I.A. Shchipeleva* ..... 69

**Rules for authors** ..... 79

## К читателям

Третий номер журнала за 2021 год укомплектован работами преимущественно микробиологического характера, а также некоторыми исследованиями с перспективной инновационной технологией. В статье Мижевой А.А., Ивановой Л.А. (Московский государственный университет пищевых производств) описан продуцент — мицелиальный гриб *Aspergillus oryzae*, эффективно перерабатывающий сконструированные из пищевых отходов питательные среды. Обоснован метод культивирования, обеспечивающий максимальный прирост биомассы этого продуцента.

Авторы из Самарского университета и Исследовательского центра РАН (Васильева Т.И. и др.) изучили влияние импульсного магнитного поля различной напряженности на антибактериальную активность бензилпенициллина в отношении бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Мамедовой М.Э. из Института генетических ресурсов НАН Азербайджана проведено сравнительное исследование новых коллекций чечевицы посредством структурного анализа их продуктивности. Выявлены восемь наиболее перспективных образцов (на основании оценки их генотипов — разные представители сортов Флор и Жасмин).

Группа сотрудников Казанского Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности (Скворцов Е.В. и др.) проанализировала влияние углеводной диеты на кишечную микрофлору крыс в состоянии дисбиоза. Показано, что углеводная диета изменяла микробный дисбаланс в сторону доминирования нормальной кишечной микрофлоры.

Красовицкая И.А. с коллегами из Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета разработали технологию выделения имбрицина (антибиотик немедицинского назначения из группы противогрибковых неполиеновых макролидов) из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*.

Сотрудники Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора (Кошкарева И.И. и др.) осуществили микробиологический анализ готовых к употреблению пищевых продуктов в нормируемом объеме. Выявлено, что из 232 проб 53,9% не соответствуют санитарно-гигиеническим требованиям. Доминировали *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp.

В разделе «Обзоры» помещены следующие статьи. Светоч Э.А. и др. (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск) на основании анализа литературы и собственных данных предложили гипотезу механизма взаимодействия бактериоцинов с чувствительными бактериальными клетками. Доронин И.А., Гаева Т.Н., Васильев Р.Г. (НИЦ «Курчатовский институт») и Аллахвердиев С.И. (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН) рассмотрели подходы к конструированию фотоэлектрических ячеек на основе фотосистемы II для продукции водорода.

Тюрина А.В. и др. из Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора обсудили вопрос о создании экспериментальных профилактических препаратов на основе холерных бактериофагов. Наконец, Кретенчук О.Ф. вместе с сотрудниками этого же института представили литературные данные о различных моделях перевиваемых клеточных линий холерных вибрионов.

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

# БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ПИЩЕВОЙ ФРАКЦИИ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ *ASPERGILLUS ORYZAE* В УДОБРЕНИЕ ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

А.А. МИЖЕВА\*, Л.А. ИВАНОВА

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», Москва

Подобран продуцент — мицелиальный гриб *Aspergillus oryzae*, который эффективно перерабатывает сконструированные из пищевых отходов питательные среды. Обоснован и выбран способ культивирования, при котором наблюдается максимальный прирост биомассы продуцента. Экспериментальным путем найдены оптимальное значение влажности субстратов — 60% — и количество посевного материала по отношению к питательной среде — 10%, при рН питательных сред 5,0–5,5. Исследование удобрений на содержание необходимого для роста и развития растений азота помогло выявить лучший образец, который в дальнейшем использовался для внесения в почву и выращивания тестового растения. Высота зеленой биомассы опытного образца более чем в 2 раза превышала высоту контрольного, посаженного в почву без удобрения.

**Ключевые слова:** органическое удобрение, твердофазное культивирование, биотрансформация, микроскопические грибы, утилизация пищевых отходов, *Aspergillus oryzae*.

## Введение

В настоящее время в мире существует серьезная проблема утилизации твердых пищевых бытовых отходов (ТБО). Увеличение их количества связано с ростом численности населения и потреблением пищевых ресурсов. Ежегодно образуется более 60 млн т бытовых отходов, 95% которых не перерабатываются надлежащим образом, а гниют на свалках и полигонах, загрязняя окружающую среду [1, 18]. В связи с этим встает приоритетная задача утилизации ТБО с целью восстановления нарушаемого экологического равновесия.

По мнению экспертов, вывоз мусора на несанкционированные свалки приведет не только к экологическим катастрофам в больших городах, но и негативно скажется на общей экологической ситуации в стране [9]. Отходы оказывают отрицательное воздействие на почву, водоемы и атмосферу [12, 14, 19]. Для того чтобы снизить негативное влияние ТБО на окружающую среду, необходимо найти такой метод утилизации, который может решить несколько проблем, а именно: экологически безопасную

переработку сырья и использование таких преобразованных продуктов в других отраслях промышленности или сельского хозяйства [5, 6].

Растительная биомасса представляет собой хороший субстрат для культивирования микроорганизмов. Она служит источником высокоценных пищевых волокон, которые, в свою очередь, могут быть отличной питательной средой для ферментации микроскопическими грибами и дрожжами. Ткани растений содержат в своем составе не только легкоусвояемые сахара, но и полисахариды, а также минеральные вещества [7, 10].

Микробиологическая биоконверсия отходов растительного происхождения является дополнительным способом переработки их в высокобелковые кормовые препараты и органические удобрения [4, 11]. Твердые пищевые бытовые отходы растительного происхождения содержат в своем составе целлюлозу, гемицеллюлозу, пектиновые вещества и прочие, однако, в отличие от отходов пищевой промышленности, не перерабатываются.

В качестве аналога уже существующих методов переработки, показавших небольшой процент эффективности, эффективным представляется способ утилизации пищевой фракции бытовых отходов, основанный на микробной биотрансформации отходов растительного сырья в биоорганическое удобрение для последующего применения в сельском хозяйстве при выращивании овощных культур. В этом отношении хорошая перспектива открывается при адекватном использовании соответствующих видов грибов.

© 2021 г. Мижева А.А., Иванова Л.А.

\* Автор для переписки:

Мижева Айслу Альбертовна,  
студент кафедры «Биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств,  
E-mail: mizheva.aislu@mail.ru

Грибы — довольно обширная и крайне разнообразная группа организмов. В своем составе они не содержат пигмента хлорофилла, поэтому лишены способности синтезировать органические вещества. В связи с этим данные организмы относят к группе хемоорганогетеротрофов [3]. Мицелиальные грибы обладают комплексом ферментов, действующим на субстрат растительного происхождения, за счет чего наблюдается существенный прирост биомассы.

*Aspergillus oryzae* — мицелиальный гриб, который нашел широкое применение в производстве традиционных японских ферментированных продуктов, таких как соевый соус, саке и многих других. Микроскопические грибы обладают способностью продуцировать ферменты, действующие на различные субстраты. Благодаря развитию технологий генной инженерии стало известно, что применение в современной биотехнологии *A. oryzae* имеет огромный потенциал для использования его в получении не только ферментных препаратов, но и в переработке отходов растительного сырья, поскольку он обладает развитой системой трансформации и выделяет большое количество ферментов [16, 21, 22].

Одной из особенностей использования этого гриба является способ ферментации. К традиционному способу культивирования этого микроорганизма относится поверхностный, но в современной промышленности используют и глубинное культивирование. В процессе твердофазной ферментации микроорганизм активно выделяет внеклеточные ферменты, которые интенсивно расщепляют субстрат до более простых составляющих [7, 15].

Применение *Aspergillus oryzae* в различных отраслях промышленности, в том числе и пищевой, побудил причислить данный микроорганизм к общепринятым и безопасным и внести в список GRAS и FDA [17]. Безопасность данного микроорганизма подтверждена Всемирной организацией здравоохранения. *A. oryzae* генетически очень близок к микроскопическому грибу *A. flavus*, который выделяет мощный природный канцероген — афлатоксин [20]. Было доказано, что в ферментированных продуктах, где в качестве культуры продуцента использовался гриб *A. oryzae*, афлатоксин и какие-либо другие канцерогенные метаболиты не обнаружены [23].

## Материалы и методы

Для приготовления питательных сред использовались картофельные и морковные очистки, отходы цитрусовых и хлебобулочных изделий, пшеничные от-

руби. Всего было смоделировано 3 варианта субстратов с различным процентным содержанием в них компонентов, заявленных выше:

1) Среда № 1 — пшеничные отруби — 20%, картофельные очистки — 20%, морковные очистки — 20%, отходы цитрусовых — 20%, хлебобулочные отходы — 20%.

2) Среда № 2 — пшеничные отруби — 20%, картофельные очистки — 10%, морковные очистки — 30%, отходы цитрусовых — 10%, хлебобулочные отходы — 30%.

3) Среда № 3 — пшеничные отруби — 50%, картофельные очистки — 20%, морковные очистки — 20%, хлебобулочные отходы — 10%.

Контрольным образцом являлась среда, состоящая на 100% из пшеничных отрубей. Все среды перед культивированием имели влажность менее 10%.

Для определения исходного содержания влаги и подбора ее оптимального значения для лучшего роста продуцента в субстрате применялся метод высушивания отобранной навески до постоянной массы в сушильном шкафу «ШС 80-01-СП».

С помощью потенциометра «АНИОН-4100» были определены значения рН питательных сред.

Для осуществления биоконверсии сырья использовался мицелиальный гриб *Aspergillus oryzae* из коллекции «чистых» культур кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств. Посевной материал получали методом смыва специально выращенной культуры микроорганизма на стерильной скошенной агаризованной среде. Смыв проводился стерильной водопроводной водой в асептических условиях. Готовая культура хранилась в холодильнике при температуре +3 °С.

Культивирование микроорганизма осуществлялось твердофазным способом в стерильных кюветах при температуре 30–32 °С в течение 7 суток в лабораторном термостате «ТС-1/80 СПУ».

Для определения содержания «сырого» протеина в полученном удобрении и в исходных субстратах использовали метод Кьельдаля [2].

## Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента было установлено, что наибольший выход биомассы *A. oryzae* удается получить на питательной среде с содержанием влаги 60% и рН 5,0–5,5 (рис. 1).



Рис. 1. Подбор влажности питательных сред

Оптимальное количество посевного материала для роста и развития микроорганизмов на таком субстрате составило 10%, поскольку при использовании 30% и 20% посевного материала в сравнении с 10% различий не наблюдалось. Следовательно, целесообразней использовать посевной материал в меньшем количестве (рис. 2).



Рис. 2. Подбор количества посевного материала

Путем визуального осмотра кювет с выросшими грибами осуществлялось определение варианта питательной среды с наибольшим выходом культуры.

Интенсификации роста и развития растений способствует достаточное количество усваиваемого растениями азота, который является основной составляющей органических удобрений. С этой целью к исходной питательной среде были добавлены минеральные соли  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в количестве 1,0% и 0,5%. На основе данных, полученных при анализе содержания «сырого» протеина по методу Кьельдаля в выросших культурах грибов и в исходной питательной среде, было определено, что трансформация минерального азота в органический обусловила повышение содержания белка в биомассе грибов. На рисунке 3 приведены сравнительные данные содержания «сырого» протеина в питательной среде до культивирования и после биоконверсии.



Рис. 3. Сравнение количества «сырого» протеина в исходной питательной среде и после биоконверсии грибами *A. oryzae*

Установлено, что содержание азота увеличилось на 27,6% по сравнению с исходной питательной средой.

Полученный продукт использовался как органическое удобрение для интенсификации роста овощных культур. Выращивание тестовых образцов растений *Lactuca sativa* «Azart» в грунте проводили с соблюдением необходимых для растений условий роста: температура – 20 °С, регулярный полив 1 раз в 2 дня, хорошо освещенное место, ежедневное опрыскивание растений чистой отстоянной водой комнатной температуры.

Тестовые растения высаживали на искусственную почву – грунт на основе верхового торфа, предназначенный для выращивания овощных культур и декоративных растений. Контрольные семена выращивали без использования удобрения. Опытные семена были посажены в почву с разработанным удобрением. На рисунке 4 показаны контрольный и опытный образцы через 1 месяц после посадки семян в почву.



Рис. 4. Контрольный (слева) и опытный образцы тестового растения *Lactuca sativa* «Azart»

Высота зеленой биомассы контрольного образца составила 6 см, тогда как высота опытного – 15 см.



Следовательно, полученное удобрение действительно благоприятно влияет на рост овощной культуры.

В сравнении с аналогичным методом получения удобрений — вермикомпостированием [8], данная разработка экономически выгоднее, так как для процесса необходимы повсеместно распространенные мицелиальные грибы, а использование вермиккультуры не нашло пока широкого распространения из-за того, что для переработки используется определенный вид червей, закупка которых обходится очень дорого [13].

### Заключение

Для биоконверсии пищевых отходов с помощью микроорганизмов были подобраны компоненты питательных сред. На их основе сконструированы субстраты, имитирующие пищевые бытовые отходы. Обоснован и выбран способ культивирования микроорганизмов для получения наибольшего выхода биомассы культуры. Разработаны условия получения посевного материала.

Согласно проведенным исследованиям, выявлено, что биоконверсия пищевой фракции отходов мицелиальными грибами представляет собой не только перспективный способ утилизации, но и метод получения продукта, влияющий на процессы всхожести и роста овощных культур. *A.oryzae*, синтезируя ферменты, эффективно перерабатывает субстрат при рН 5,0–5,5 с влажностью 60%, в продукт, пригодный для использования в сельскохозяйственной отрасли.

Проведено исследование по оценке влияния полученного органического удобрения на рост *Lactuca sativa* «Azart». Опытный образец был на 9 см выше контрольного образца.

В дальнейшем планируется добавление новых компонентов питательных сред, подбор продуцентов и апробация полученных вариантов не только на овощных культурах, но и на декоративных растениях.

### Литература

1. Аллахвердиев С.Р., Ерошенко В.И. Современные технологии в органическом земледелии // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2017. — № 1–1. — С. 76–79.
2. Бутова С.Н., Иванова Л.А., Чурмасова Л.А., Индисова Г.Е., Фоменко И.А. Лабораторный практикум по дисциплине «Биотехнология ферментных препаратов». — М.: Изд-во Перо, 2020. — 130 с.
3. Власов Д.Ю. Микроскопические грибы в экстремальных местообитаниях: биологическое разнообразие и сущность

- взаимодействий // Биосфера. — 2011. — № 4. — С. 479–492.
4. Ивенин В.В., Михалев Е.В., Ивенин А.В. Использование биологических отходов сельскохозяйственного производства в качестве органического удобрения // Агротехнический вестник. — 2011. — № 4. — С. 26–28.
5. Карцев Б.В., Мусинова Н.Н. Современные проблемы обращения с твердыми коммунальными отходами на региональном уровне // Экономика и предпринимательство. — 2017. — № 9–2 (86). — С. 178–181.
6. Кирилова А.Н., Мусинова Н.Н. Поиск рациональных подходов к развитию сферы обращения с отходами // Экономика и предпринимательство. — 2017. — № 9–3 (86). — С. 788–791.
7. Кононенко Г.П., Пирязева Е.А., Зотова А.А., Буркин А.А. Видовой состав и токсикологическая характеристика грибов рода *Aspergillus*, выделенных из грубых кормов // Сельхозбиология. — 2017. — № 6. — С. 1279–1286.
8. Корсунова Т.М. Биотехнология конверсии органических отходов вермиккультурой и применение биогаза // Вестник КрасГАУ. — 2014. — № 5. — С. 55–57.
9. Мельников Д.Е., Рогуля А.С. Твердые бытовые отходы, утилизация // Синергия наук. — 2016. — № 6. — С. 538–544.
10. Платонова А.С., Зайнутдинова А.Ф., Гаянова К.Р., Нафикова Э.В. Анализ технологий и способов переработки органических отходов урбанизированных территорий // Modern Science. — 2020. — № 12-5. — С. 394–398.
11. Ромалийский В.С., Карташов С.Г. Углеводно-белковый корм на основе растительного сырья // Вестник ВНИИМЖ 2015; — № 4(20). — С. 15–18.
12. Румянцева В.В., Дмитренко С.И., Коломыцева В.В. Использование принципов биоконверсии для глубокой переработки плодовоовощного сырья / В сб. статей по материалам IV научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Краснодар, 23 марта 2018 года: Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции. — Краснодар, Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, 2018. — С. 291–294.
13. Турсунбаев С.Ж. Вермикультивирование как способ переработки органических отходов / Материалы VII международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки и образования в области естественных и сельскохозяйственных наук», посвященной 90-летию академика К. Ташенова. — Петропавловск: Северо-Казахстанский государственный университет им. М. Козыбаева. — 2018. — Т. 2. — С. 205–207.
14. Хмельченко Е.Г. Проблемы утилизации твердых коммунальных отходов в Российской Федерации и пути их решения // Муниципальная академия. — 2018. — № 2. — С. 110–114.
15. Bok J.W., Keller N.P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. // Cell. — 2004; — Vol. 3. — P. 527–535.

16. Christensen T., Woeldike H., Boel E. et al. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae* // Nat. Biotechnol. — 1988. — Vol. 6. — P. 1419–1422.
17. Gomi K, Abe K. Food products fermented by *Aspergillus oryzae* / In: The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods. — Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. — P. 427–437.
18. Kapninova O.S., Golovina T.A., Polyagin A.V. Strategic management of the food industry based on environmentally responsible business principles // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. — 2016. — Vol. 58. — No. 10. — P. 149–157. doi: 10.18551/rjoas.2016-10.17.
19. Kostecka J., Garczyńska M., Pączka G. Food waste in the organic recycling system and sustainable development // Problemy Ekorozwoju. — 2018. — Vol. 13. — No. 2. — P. 157–164.
20. Lee C.Z., Liou G.Y., Yuan G.F. Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi // Microbiology. — 2006. — Vol. 152. — P. 161–170.
21. Mashida M., Yamada O., and Gomi K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the history of koji mold and exploration of its future // DNA Research. — 2008. — Vol. 15. — No. 4. — P. 173–183. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn020>.
22. Payne G.A., Nierman W.C., Wortman J.R., Pritchard B.L., Brown D., Dean R.A., et al. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae* // Med. Mycol. — 2006. — Vol. 44(Suppl. 1). — S9–S11. <https://doi.org/10.1080/13693780600835716>.
23. Yu J., Whitelaw C.A., Nierman W.C., Bhatnagar D., Cleveland T.E. *Aspergillus flavus* sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops // FEMS Microbiol. Lett. — 2004. — Vol. 237. — P. 333–340.
- regional'nom urovne. Ekonomika i predprinimatel'stvo 2017; 9–2(86):178–181 (in Russian).
6. Kirilova AN, Musinova NN. Poisk ratsional'nykh podkhodov k razvitiyu sfery obrashcheniya s otkhodami. Ekonomika i predprinimatel'stvo 2017; 9–3(86):788–791 (in Russian).
7. Kononenko GP, Piryazeva YeA, Zotova AA, Burkin AA. Vidovoy sostav i toksikologicheskaya kharakteristika gribov roda *Aspergillus*, vydelenykh iz grubyykh kormov. Sel'khozbiologiya 2017; 6:1279–1286 (in Russian).
8. Korsunova TM. Biotekhnologiya konversii organicheskikh otkhodov vermikul'turoy i primeneniye biogumusa. Vestnik KrasGAU 2014; 5:55–57 (in Russian).
9. Mel'nikov DYe, Rogulya AS. Tverdye bytovyye otkhody, utilizatsiya. Sinergiya nauk 2016; 6:538–544 (in Russian).
10. Platonova AS, Zaynutdinova AF, Gayanova KR, Nafikova EV. Analiz tekhnologiy i sposobov pererabotki organicheskikh otkhodov urbanizirovannykh territoriy. Modern Science 2020; 12-5:394–398 (in Russian).
11. Romaliyskiy VS, Kartashov SG. Uglevodno-belkovyy korm na osnove rastitel'nogo syr'ya. Vestnik VNIIMZH 2015; 4(20):15–18 (in Russian).
12. Rumyantseva VV, Dmitrenko SI, Kolomytseva VV. Ispol'zovaniye printsipov biokonversii dlya glubokoy pererabotki plodoovoshchnogo syr'ya. V sb. statey po materialam IV nauchno-prakticheskoy konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh, Krasnodar, 23 marta 2018 goda: Sovremennyye aspekty proizvodstva i pererabotki sel'skokhozyaystvennoy produktsii. Krasnodar, Kubanskiy gosudarstvennyy agrarnyy universitet im IT Trubilina, 2018: 291–294 (in Russian).
13. Tursunbayev SZh. Vermikul'tivirovaniye kak sposob pererabotki organicheskikh otkhodov. Materialy VII mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nyye problemy nauki i obrazovaniya v oblasti yestestvennykh i sel'skokhozyaystvennykh nauk», posvyashchennoy 90-letiyu akademika K Tashenova. Petropavlovsk: Severo-Kazakhstanskiy gosudarstvennyy universitet im M Kozybayeva, 2018; 2:205–207 (in Russian).
14. Khmel'chenko YeG. Problemy utilizatsii tvordyykh kommunal'nykh otkhodov v Rossiyskoy Federatsii i puti ikh resheniya. Munitsipal'naya akademiya 2018; 2:110–114 (in Russian).
15. Bok JW, Keller NP. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. Cell 2004; 3:527–535.
16. Christensen T., Woeldike H., Boel E. et al. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. Nat Biotechnol 1988; 6:1419–1422.
17. Gomi K, Abe K. Food products fermented by *Aspergillus oryzae* / In The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007: 427–437.
18. Kapninova OS, Golovina TA, Polyagin AV. Strategic management of the food industry based on environmentally responsible business principles. Russian Journal of Agricultural

## References

1. Allakhverdiyev SR, Yeroshenko VI. Sovremennyye tekhnologii v organicheskom zemledelii. Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy 2017; 1–1:76–79 (in Russian).
2. Butova SN, Ivanova LA, Churmasova LA, Indisova GYe, Fomenko IA. Laboratornyy praktikum po distsipline «Biotekhnologiya fermentnykh preparatov». Moscow: Izd-vo Pero, 2020: 130 (in Russian).
3. Vlasov DYu. Mikroskopicheskiye griby v ekstremal'nykh mestoobitaniyakh: biologicheskoye raznoobrazie i sushchnost' vzaimodeystviy. Biosfera 2011; 4:479–492 (in Russian).
4. Ivenin VV, Mikhalev YeV, Ivenin AV. Ispol'zovaniye biologicheskikh otkhodov sel'skokhozyaystvennogo proizvodstva v kachestve organicheskogo udobreniya. Agrokhimicheskyy vestnik 2011; 4:26–28 (in Russian).
5. Kartsev BV, Musinova NN. Sovremennyye problemy obrashcheniya s tvordymi kommunal'nymi otkhodami na

- and Socio-Economic Sciences 2016;58(10):149–157. doi: 10.18551/rjoas.2016-10.17.
19. Kostecka J, Garczyńska M, Pączka G. Food waste in the organic recycling system and sustainable development. *Problemy Ekorozwoju* 2018; 13(2):157–164.
20. Lee CZ, Liou GY, Yuan GF. Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi. *Microbiology* 2006; 152:161–170.
21. Mashida M, Yamada O, and Gomi K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Research* 2008; 15(4):173–183. doi: 10.1093/dnares/dsn020.
22. Payne GA, Nierman WC, Wortman JR, Pritchard BL, Brown D, Dean RA, et al. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Med Mycol* 2006; 44(Suppl. 1):S9–S11. doi: 10.1080/13693780600835716.
23. Yu J, Whitelaw CA, Nierman WC, Bhatnagar D, Cleveland TE. *Aspergillus flavus* sequence tags for identification of genes with putative roles in aflatoxin contamination of crops. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 237:333–340.

## BIOTRANSFORMATION OF THE FOOD FRACTION OF HOUSEHOLD WASTE BY MEANS OF MYCELIAL MUSHROOMS *ASPERGILLUS ORYZAE* INTO THE FERTILIZER FOR AGRICULTURAL CROPS

A.A. MIZHEVA, L.A. IVANOVA

*Moscow State University of Food Production, Moscow*

A producer was selected – the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, which efficiently processes nutrient media constructed from food waste. The method of cultivation was substantiated and selected, in which the maximum increase in the biomass of the producer is observed. Experimentally, the optimum value of the substrate moisture content – 60% – and the amount of inoculum in relation to the nutrient medium were found – 10%, at a pH of the nutrient media of 5.0–5.5. The study of fertilizers for the content of nitrogen necessary for the growth and development of plants helped to identify the best sample, which was later used for applying to the soil and growing the test plant. The height of the green biomass of the experimental sample was more than 2 times higher than the height of the control, which was planted in the soil without fertilization.

**Keywords:** organic fertilizer, solid-phase cultivation, biotransformation, microscopic fungi, food waste disposal, *Aspergillus oryzae*.

### **Address:**

Mizheva A.A.,  
student of the Department of Biotechnology and Technology of Bioorganic Synthesis Products,  
Moscow State University of Food Production,  
E-mail: mizheva.aislu@mail.ru

### **Для цитирования:**

Мижева А.А., Иванова Л.А. Биотрансформация пищевой фракции бытовых отходов мицелиальными грибами *Aspergillus oryzae* в удобрение для сельскохозяйственных культур. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(3):6–11.

### **For citation:**

Mizheva A.A., Ivanova L.A. Biotransformation of the food fraction of household waste by means of mycelial mushrooms *Aspergillus oryzae* into the fertilizer for agricultural crops. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(3):6–11 (in Russian).

# ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА НАТРИЕВОЙ СОЛИ, ОБРАБОТАННОЙ ИМПУЛЬСНЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ, В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *ESCHERICHIA COLI*

Т.И. ВАСИЛЬЕВА<sup>1\*</sup>, Н.А. РОДЕНКО<sup>1,2</sup>, А.К. МАДЬЯРОВА<sup>1</sup>, И.А. БЕЛЯЕВА<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева,

<sup>2</sup>Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Самара

В работе ставилась цель — изучить влияние импульсного магнитного поля (ИМП) различной напряженности на антибактериальную активность бензилпенициллина в отношении бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Для определения чувствительности бактериальной культуры к обработанному ИМП антибиотику был использован стандартный диско-диффузионный метод. Показано, что обработанный ИМП бензилпенициллин не изменяет антибактериальную активность в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, но при этом установлено увеличение антибактериальной активности антибиотика после обработки ИМП в отношении культуры *Escherichia coli*.

**Ключевые слова:** антибактериальная активность, импульсное магнитное поле, бензилпенициллина натриевая соль, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

## Введение

Магнитные поля Земли влияют на биохимические процессы, протекающие в клетках. Поэтому для специалистов в области биологии важно иметь представление о воздействии магнитных полей на элементарные химические реакции. При исследовании внешних воздействий на биосистемы речь идет о биологическом эффекте. В его основе лежит изучение разницы протекания каких-либо биологических процессов в экспериментальной группе (с воздействием магнитного поля) и в контрольной группе (без воздействия магнитного поля) [3]. При изучении действия магнитных полей обращается внимание на рассмотрение химических реакций с акцентом на образование химических связей [2].

В большом количестве работ представлены данные о влиянии постоянного и переменного магнитного поля на химические и биологические системы. Было показано [13], что магнитное поле может увеличивать влияние цисплатина (противоопухолевое средство) на процент жизнеспособно-

сти клеток и уменьшать устойчивость клеток A2780-CP, создавая крупные структуры на поверхности клеточной мембраны. Также обнаружено, что воздействие магнитным полем с частотой 66 кГц при напряженности магнитного поля 500 А/м приводит к конформационным изменениям молекул ферментов антиоксидантной системы (каталазы и супероксиддисмутазы), что и является причиной снижения их активности [1]. Сообщалось об активирующем эффекте растворов, обработанных электромагнитными полями [5].

В настоящем исследовании была поставлена цель — оценить влияние импульсного магнитного поля на антибактериальную активность бензилпенициллина натриевой соли в отношении культуры *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

## Материалы и методы

**Техническая составляющая.** Проведены исследования по влиянию ИМП на биологическую активность порошкообразного бензилпенициллина с параметрами ИМП, представленными в таблице 1.

Таблица 1

### Параметры воздействия ИМП на бензилпенициллина натриевую соль

U, кV	3,0	7,0	9,0
H, (одновитковый индуктор), А/м·10 <sup>6</sup>	0,09	0,50	0,82
f, кГц частота разрядного контура	40		

© 2021 г. Васильева Т.И., Роденко Н.А., Мадьярова А.К., Беляева И.А.

\* Автор для переписки:

Васильева Татьяна Ивановна,

канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии Самарского национального исследовательского университета

E-mail: vastaty@rambler.ru

Воздействие ИМП на бензилпенициллин осуществлялось на магнитно-импульсной установке МИУ-15 (Самарский университет, Самара): в одновитковый индуктор вставлялся флакон с антибиотиком и проводилась однократная обработка с длительностью 0,0002–0,005 с [4, 9].

Изучение биологической активности бензилпенициллина. В экспериментах брали бензилпенициллин в порошкообразном виде (1 000 000 ЕД). После обработки ИМП порошкообразный антибиотик доводили до концентрации 0,01 г/мл. В качестве объекта исследования служили грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* и грамотрицательные бактерии *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* М17 — штамм кишечной палочки получен из медицинского сертифицированного препарата «Колибактерин», предназначенного для лечения желудочно-кишечных расстройств у людей. Культура микроорганизмов *Staphylococcus aureus* (рис. 1) была предоставлена микробиологическим отделом Центральной клинико-диагностической лаборатории Клиник Самарского государственного медицинского университета (г. Самара).

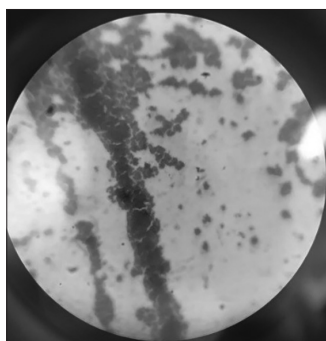


Рис. 1. Культура микроорганизмов *Staphylococcus aureus* в микроскопе Альтами 104 LED

В стерильные чашки Петри, расположенные на горизонтальной поверхности, разливали по 15 мл плотной питательной среды. Для исследования биологической активности антибиотика на культуре микроорганизмов *Escherichia coli* применялся мясопептонный агар (МПА). Для культуры микроорганизмов *Staphylococcus aureus* готовилась элективная питательная солевая среда (ИПС-Биотехновация, Россия).

Инокуляты *Escherichia coli* готовились внесением 1 г сухой культуры в 10 мл среды, состав которой был следующим: пептон — 5 г/л; глюкоза — 10 г/л; NaCl — 4,68 г/л; KCl — 1,48 г/л; NH<sub>4</sub>Cl — 1,08. Инокуляты *Staphylococcus aureus* готовили внесением бактериальной культуры в 10 мл среды, состав среды: 3,75 г мясопептонного бульона на 250 мл дистиллированной воды.

Далее на поверхность застывшей питательной среды распределяли по 0,1 мл инокулята испытуемой суточной культуры микроорганизмов. На чашку Петри раскладывались бумажные диски и пропитывались раствором бензилпенициллина по 10 мкл на каждый диск. Затем чашки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 18 ч.

Результаты учитывали путем замера зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков (включая диаметр самого диска) с помощью штангенциркуля (погрешность измерения ±0,1 мм). Измерение диаметра каждой зоны лизиса проводилось не менее 10 раз, после чего осуществлялся расчет среднего диаметра. Для повышения достоверности результатов проводились независимые серии повторных экспериментов. Единичные колонии или тонкая пленка роста внутри зоны задержки роста не учитывались [8].

## Результаты и обсуждение

На рисунке 2 представлены результаты эксперимента по изучению биологической активности антибиотика относительно бактерий *Staphylococcus aureus* при воздействии ИМП на аптечный порошкообразный бензилпенициллин.

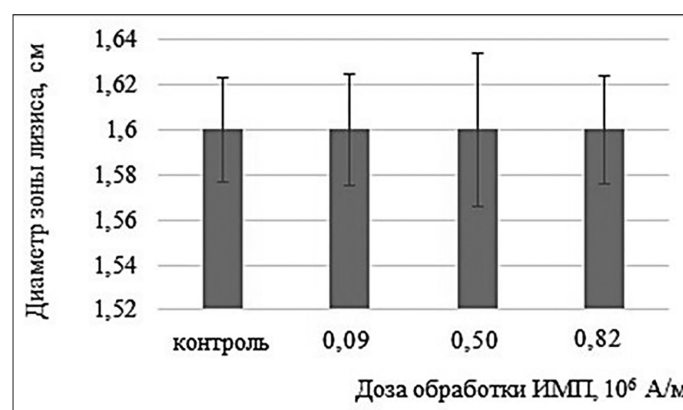


Рис. 2. Диаметры зон подавления роста *Staphylococcus aureus* при воздействии ИМП на аптечный порошкообразный бензилпенициллин

Как видно из рисунка 2, при воздействии ИМП на бензилпенициллин не наблюдается изменения биологической активности. Однако было зафиксировано, что при обработке ИМП аптечного бензилпенициллина наблюдается рост диаметра зон лизиса в отношении грамотрицательной культуры *Escherichia coli*, что свидетельствует об увеличении его антибактериальной активности (рис. 3).

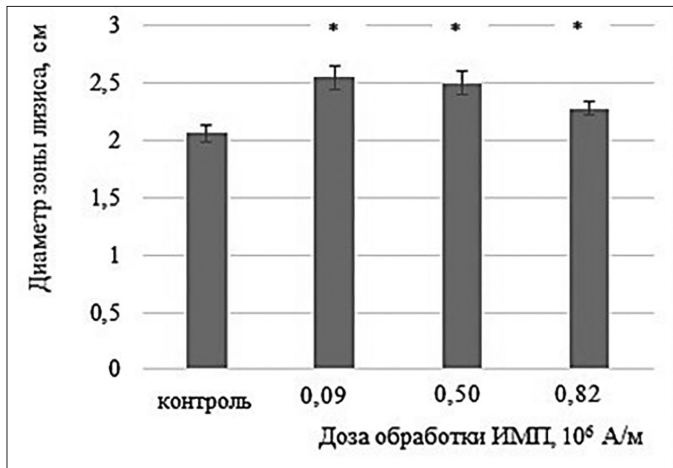


Рис.3. Диаметры зон подавления роста *Escherichia coli* при воздействии ИМП на аптечный порошокобразный бензилпенициллин. *Примечание:* \* — отличия диаметра зоны подавления роста *Escherichia coli* после воздействия ИМП на бензилпенициллина достоверны от контроля с уровнем значимости  $p < 0,05$ .

Отличия в изменении биологической активности, скорее всего, связаны с различным строением клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий (рис. 4).

Механизм действия бета-лактамовых антибиотиков основывается на ингибировании синтеза клеточной стенки путем блокировки действия пенициллинсвязывающих бел-

ков — транспептидаз. Транспептидазы участвуют в сборке бактериальной клеточной стенки путем включения ацетилмурамовых пептидов в строящиеся клеточные стенки бактерий, катализируя образование шивок — перекрестных связей между цепочками пептидогликана. Шивки дают дополнительную прочность клеточной стенке [6, 12].

Предполагается, что действие ИМП незначительно изменяет конформацию молекулы антибиотика в зависимости от заданных параметров импульсного магнитного поля. При некоторых конформационных положениях у молекулы пенициллина повышается сродство к активному центру транспептидазы, связываясь с ней ковалентной связью, его антибактериальная активность увеличивается [11].

Отличие биологической активности антибиотика в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий можно объяснить следующими причинами: большое количество слоев пептидогликана в клеточной стенке грамположительных бактерий (50–100 слоев), по сравнению с грамотрицательными микроорганизмами (1–2 слоя).

Известно, что около 80–90% штаммов *Staphylococcus aureus* являются пенициллиназообразующими. Это значит, что они вырабатывают фермент пенициллиназу, способную инактивировать бета-лактамы антибиотика [10].

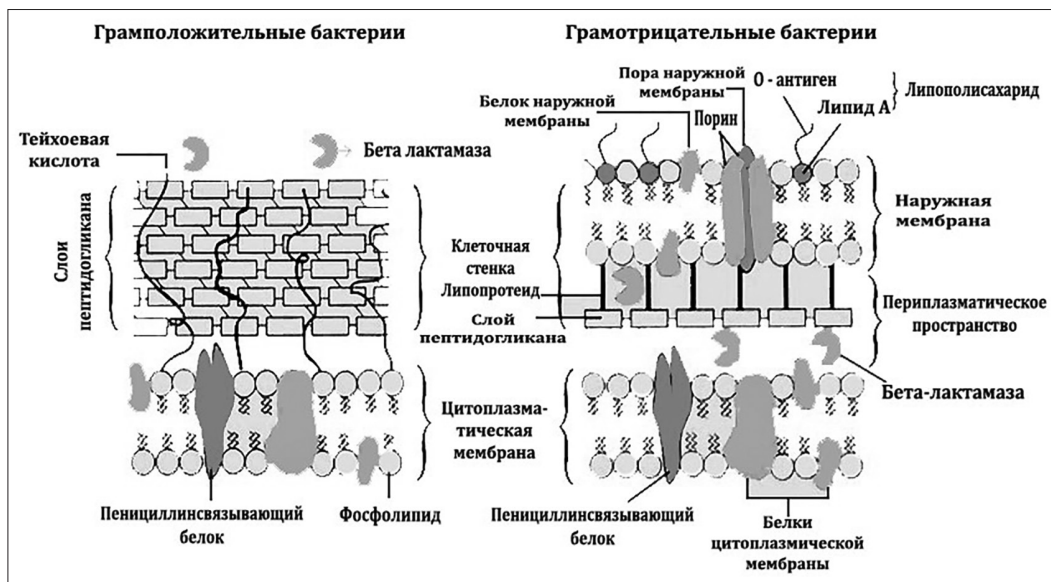


Рис.4. Строение клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий [7]

Проведя анализ экспериментальных данных, можно отметить общее снижение антибактериальной активности не обработанного ИМП бензилпеницилина на грамотрицательную культуру *Escherichia coli* по сравнению с грамположительными бактериями *Staphylococcus*

*aureus*. Причем, средний диаметр зон лизиса *Escherichia coli* составил около 2,3 см, а культуры *Staphylococcus aureus* — около 1,6 см.

Возможно, отсутствие изменения антибактериальной активности при обработке ИМП бензилпени-

цилина в отношении *Staphylococcus aureus* связано с расщеплением антибиотика специфическим ферментом микроорганизмов — пенициллиназой.

Антибактериальная активность обработанного импульсным магнитным полем бензилпеницилина может быть различной. Биологический эффект зависит от строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также от их метаболизма.

### Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Получены экспериментальные данные о том, что обработанный ИМП бензилпенициллин не изменяет антибактериальную активность в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, но при этом было зафиксировано увеличение антибактериальной активности антибиотика после обработки ИМП в отношении культуры *Escherichia coli*.

2. Предполагается, что регистрируемый эффект можно объяснить разницей в строении клеточной стенки исследуемых микроорганизмов, а также продуцированием фермента пенициллиназы грамположительными культурами (например, *Staphylococcus aureus*).

### Благодарности

Авторы выражают признательность Лямину Артему Викторовичу, заведующему бактериологическим отделом Клинико-диагностической лаборатории Клиники Самарского государственного медицинского университета за оказанную помощь при проведении данных исследований.

Данное исследование было поддержано Фондом содействия инновациям в рамках программы «УМНИК».

### Литература

1. Азанова А.В., Сергеева Е.Ю., Фефелова Ю.А., Сергеев Н.В., Цугленок Н.В. Исследование действия магнитного поля промышленной частоты как экологического фактора, изменяющего активность ферментов антиоксидантной системы человека // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. — 2012. — № 5(68) — С. 254–256.
2. Бинги В.Н. Магнитобиология: эксперименты и модели. — М.: МИЛТА, 2002. — 592 с.
3. Бучаченко А.Л., Сагдеев Р.Э., Салихов К.М. Магнитные и спиновые эффекты в химических реакциях. — Новосибирск: Наука, 1978. — 296 с.

4. Глушченков В.А., Карпукhin В.Ф. Технология магнитно-импульсной обработки материалов. — Самара: Изд-во Федоров, 2014. — 208 с.
5. Готовский М.Ю. Пат. 2283090 Российская Федерация МПК А 61 К 9/14, А 61 Н 39/100, А 61 К 9/08. Препарат для активизации жизнедеятельности биологического объекта и способ получения препарата. — № 2004138996/15; опубл. 10.09.2006, Бюл. № 25. — 7 с.
6. Желдакова Р.А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов: учеб.-метод. комплекс для студентов специальности «Биология». — Мн.: БГУ, 2004. — 111 с.
7. Кленова Н.А. Лабораторный практикум по микробиологии. — Самара: Самарский университет, 2012. — 102 с.
8. Прозоркина Н.В., Рубашкина Л.А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для средних специальных медицинских учебных заведений. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2013. — 378 с.
9. Юсупов Р.Ю., Глушченков В.А. Энергетические установки для магнитно-импульсной обработки материалов. — Самара: Изд-во Федоров, 2013. — 123 с.
10. Bartlett J.G. et al. Practice guidelines for management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America // Clinical Infect. Diseases. — 2000. — Vol. 31(2). — P. 347–382. doi: 10.1086/313954.
11. Bern M., Beniston R., Mesnage S. Towards an automated analysis of bacterial peptidoglycan structure // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2017. — Vol. 409. — No. 2. — P. 551–560.
12. <https://sportguardian.ru/article/3895/penitsillini>.
13. Jalali A., Zafari J., Jouni F.J., Abdolmaleki P., Shirazi F.H., Khodayar M.J. Combination of static magnetic field and cisplatin in order to reduce drug resistance in cancer cell lines // International Journal of Radiation Biology. — 2019. — Vol. 95. — No. 8. — P. 1194–1201.

### References

1. Azanova AV, Sergeyeva Ye Yu, Fefelova YUa, Sergeyev NV, Tsuglenok NV. Issledovaniye deystviya magnitnogo polya promyshlennoy chastoty kak ekologicheskogo faktora, izmenyayushchego aktivnost' fermentov antioksidantnoy sistemy cheloveka. Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta 2012; 5(68):254–256 (in Russian).
2. Bingi VN. Magnitobiologiya: eksperimenty i modeli. Moscow: MILTA, 2002: 592 (in Russian).
3. Buchachenko AL Sagdeyev RZ, Salikhov KM. Magnitnyye i spinovyye efekty v khimicheskikh reaktsiyakh. Novosibirsk: Nauka, 1978: 296 (in Russian).
4. Glushchenkov VA, Karpukhin VF. Tekhnologiya magnitno-impul'snoy obrabotki materialov. Samara: Izd-vo Fedorov, 2014: 208 (in Russian).

5. Gotovskiy MYu. Pat 2283090 Rossiyskaya Federatsiya MPK A 61 K 9/14, A 61 H 39/100, A 61 K 9/08. Preparat dlya aktivizatsii zhiznedeyatel'nosti biologicheskogo ob'yekta i sposob polucheniya preparata. № 2004138996/15; opubl 10.09.2006, Byul 25: 7 (in Russian).
6. Zheldakova RA. Mekhanizmy biosinteza antibiotikov i ikh deystviye na kletki mikroorganizmov: ucheb-metod kompleks dlya studentov spetsial'nosti «Biologiya». Minsk: BGU, 2004: 111 (in Russian).
7. Klenova NA. Laboratornyy praktikum po mikrobiologii. Samara: Samarskiy universitet, 2012: 102 (in Russian).
8. Prozorkina NV, Rubashkina LA. Osnovy mikrobiologii, virusologii i immunologii: Uchebnoye posobiye dlya srednikh spetsial'nykh meditsinskikh uchebnykh zavedeniy. Rostov-na-Donu: Feniks, 2013: 378 (in Russian).
9. Yusupov RYu, Glushchenkov VA. Energeticheskiye ustanovki dlya magnitno-impul'snoy obrabotki materialov. Samara: Izdvo Fedorov, 2013: 123 (in Russian).
10. Bartlett JG et al. Practice guidelines for management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. Clinical Infect Diseases 2000; 31(2):347–382. doi: 10.1086/313954.
11. Bern M, Beniston R, Mesnage S. Towards an automated analysis of bacterial peptidoglycan structure. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2017; 409(2)551–560.
12. <https://sportguardian.ru/article/3895/penitsillini>.
13. Jalali A, Zafari J, Jouni FJ, Abdolmaleki P, Shirazi FH, Khodayar MJ. Combination of static magnetic field and cisplatin in order to reduce drug resistance in cancer cell lines. International Journal of Radiation Biology 2019; 95(8)1194–1201.

## STUDY OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BENZYL PENICILLIN SODIUM SALT, TREATED WITH A PULSED MAGNETIC FIELD, AGAINST BACTERIA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *ESCHERICHIA COLI*

T.I. VASILIEVA<sup>1</sup>, N.A. RODENKO<sup>1,2</sup>, A.K. MADYAROVA<sup>1</sup>, I.A. BELYAEVA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Samara National Research University named after academician S.P. Korolev,

<sup>2</sup> Samara Federal Research Center RAS, Samara

The aim of this work was to study the effect of a pulsed magnetic field (PMF) of various strengths on the antibacterial activity of benzylpenicillin against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. To determine the sensitivity of the bacterial culture to the antibiotic treated with PMF, the standard disco-diffusion method was used. It has been shown that benzylpenicillin treated with PMF does not change the antibacterial activity against the bacteria *Staphylococcus aureus*, but an increase in the antibacterial activity of the antibiotic after PMF treatment against the *Escherichia coli* culture has been established.

**Keywords:** antibacterial activity, pulsed magnetic field, benzylpenicillin sodium salt, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

### Address:

Vasilyeva T.I., Ph.D.

Associate Professor of the Department of Biochemistry, Biotechnology and Bioengineering,

Samara National Research University

E-mail: vastaty@rambler.ru

### Для цитирования:

Васильева Т.И., Роденко Н.А., Мадьярова А.К., Беляева И.А. Изучение антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли, обработанной импульсным магнитным полем, в отношении бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(3):12–16.

### For citation:

Vasilieva T.I., Rodenko N.A., Madyarova A.K., Belyaeva I.A. Study of the antibacterial activity of benzylpenicillin sodium salt, treated with a pulsed magnetic field, against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(3):12–16 (in Russian).



УДК 635.658:631.523:581.14:631.527

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕМЕНТОВ СТРУКТУРЫ УРОЖАЙНОСТИ ГЕНОТИПОВ ЧЕЧЕВИЦЫ СТАТИСТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ (*LENS CULINARIS* MEDIK.)

М.Э. МАМЕДОВА\*

Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан

В ходе исследования было проведено сравнительное исследование на основе структурного анализа некоторых параметров продуктивности новых коллекций чечевицы. В генотипах были зафиксированы средние генетические различия по высоте растения, количеству семян в бобах, количеству бобов на растении и массе 100 семян. 31% исследованных образцов были признаны высокоурожайными, 43% — среднеурожайными, а 26% — низкоурожайными. Генотипы Flip 2011-61, Flip 2011-41, Flip 2011-43, 10941, 10940, 10939, 10929 и Жасмин оценены как наиболее перспективные образцы.

*Ключевые слова:* чечевица, урожайность, качество, корреляция.

### Введение

Голод и недоедание — одна из важнейших проблем современности. Ограниченная доступность некоторых аминокислот и высокая стоимость продуктов животного происхождения сделали бобовые культуры важной альтернативой для удовлетворения потребностей в белке (Bukak, 2003 [4]).

Бобовые культуры богаты белком, они выращиваются для пищевых, кормовых и технических целей. Из-за низкого содержания протеина (в производимых кормах кормовая единица составляет 85–86 г перевариваемого протеина) потребление корма происходит выше нормы. По зоотехнической норме, это приводит к росту цен на продукцию животного происхождения. На каждую кормовую единицу должно приходиться 105–110 г перевариваемого протеина. Бобовые содержат все аминокислоты, необходимые человеку и животным. Семена и плоды содержат большое количество различных витаминов (А, В, С, РР и др.), необходимых для нормального функционирования организма.

Злаки и бобовые имеют большое значение как основной источник высокобелковой пищи и различных видов кормов для сельскохозяйственных животных.

Бобовые имеют ряд преимуществ перед другими небобовыми культурами. Во-первых, вегетативные и генеративные органы бобовых культур в 2–3 раза богаче белком, чем другие растения. Семена, стебли, ветви и листья бобовых содержат большое количество белка. Во время кормления сельскохозяйственных животных зернобобовыми, а также смесью зернобобовых увеличивается переваримость протеина зерна на 20–50%. 80–90% белка бобовых культур хорошо усваивается животным организмом.

Еще одно преимущество бобовых культур состоит в том, что они накапливают много азота на одном участке земли. Белок, производимый бобовыми, очень дешево обходится для хозяйства. Бобовые являются хорошими предшественниками для большинства небобовых растений. С пожнивными остатками корней и ревеня бобовые сохраняют в почве значительное количество азота и другие питательные вещества. Бобовые культуры выращивают для получения сухой травы, зеленой массы и силоса. Семена бобовых также богаты незаменимыми аминокислотами. Соя, бобы, чечевица, зеленый горошек и нут богаты незаменимым лизином, метионином, триптофаном. Процент переваримости протеинов этих бобовых организмом высокий.

Чечевица (*Lens culinaris* Medik.) — одна из первых и самых ценных бобовых культур и выращивается на зерно. Для развивающихся стран она считается важным продуктом питания с высоким содержанием протеина. Особенно важную роль играют в пищеварении у жвачных животных также солома чечевицы, которая содержит 13% протеина (Gupta, 1996 [8]).

© 2021 г. Мамедова М.Э.

\* **Автор для переписки:**

Мамедова М.Э.

Научный сотрудник отдела биохимии института генетических ресурсов НАНА

Институт генетических ресурсов НАНА, Баку, Азербайджан

E-mail: shamsiye@bk.ru

Чечевица не накапливает нитраты, токсичные вещества, радионуклиды и поэтому представляет собой экологически чистый продукт. Хозяйственное значение чечевицы напрямую связано с химическим составом ее семян. В чечевице содержится до 22–35% белка, 48–53% углеводов, 0,6–2% жира и 2,2–4,4% минеральных солей. Кроме того, в чечевице присутствуют такие микроэлементы, как Fe, Zn, P, Ca, B, и витамины групп C,  $\beta$ -каротин (Chehriřali, 1988 [5], Saxena M.C., 1981 [14]). Фибриллярные волокна и сапонины в составе чечевицы препятствуют росту опухоли, подавляя синтез ДНК в раковых клетках (Montemurro F., 2005 [12]).

В последние годы усиление засухи в Азербайджане препятствует выращиванию устойчивых к дождю и засухе образцов чечевицы, а нестабильные урожаи вынуждают фермеров искать новые сорта. Создание высокоурожайных, устойчивых к засухе и болезням, скороспелых, высокорослых, но устойчивых к полеганию, здоровых сортов — основные требования фермеров. В этом направлении ведутся различные исследования (Amirov, 2014 [1], Mirzaev R.S., 2014 [11], Yusifov, 2011 [18]).

Помимо высокой урожайности, важно изучить другие количественные и качественные характеристик бобовых. Из-за узкой генетической базы этой культуры сложно создать разные сорта по любому признаку, но в этом отношении включение в исследования большого количества генотипов из мировой коллекции может быть полезным (Ayadogan, 2008 [2], Beecher, 2001 [3]).

## Материалы и методы

Характеристика генотипов чечевицы проводилась в полевых условиях на Апшеронской научно-исследовательской базе в двух экспериментальных условиях (с орошением и без орошения) в течение 2013–2016 гг. Начиная со стадии цветения, один повтор образца поливался регулярно, а другой повтор — 1 раз в два дня. Были проведены наблюдения и сравнивались результаты структурного анализа. Анализы осуществлялись отдельно по годам, и на основе общих результатов за два года с помощью кластерного анализа была построена дендрограмма.

Образцы выращивались в нормальных (орошаемых) условиях на Апшеронской опытной базе Института генетических ресурсов НАНА в 2013–2016 гг. По схеме посева расстояние между рядами составляло 45 см, длина ряда — 2 м, расстояние между растениями — 5 см. Глубина заделки семян составила 5–7 см. В течение вегетационного периода проводились морфологические (количество цветков, окраска и др.) и фенологические (первые всходы,

50% цветение и др.) наблюдения, а также выполнялись агротехнические работы. После полной зрелости из каждого образца отбирались 10 растений с корнями и проводилось сравнительное исследование на основе структурного анализа по 9 параметрам продуктивности (высота растения, количество продуктивных стеблей, количество бобов на растении, количество семян на растение, масса семян на растении, масса 100 семян, количество семян на один боб, ширина и длина бобов). Классификация изучаемых образцов осуществлялась согласно каталогу (табл. 1).

Высота растения (в см) на 10 случайно выбранных растениях определялась путем измерения части почвы от верха почвы до самой высокой точки растения. С целью определения массы (г) 100 семян, взятых из образцов, они были разделены на 4 группы по 100 семян в каждой, их масса измерялась и определялось среднее число. Количество бобов и семян (единиц) определялось путем подсчета бобов и семян на 10 случайно выбранных растениях и по определению среднего числа. Ширина и длина боба измерялись линейкой.

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью компьютерной программы SPSS. Степень вариации компонентов продуктивности между генотипами и статистическую значимость этой вариации оценивали методом ANOVA. Была рассчитана фенотипическая корреляция между признаками, анализ основных компонентов использовался для определения компонентов, ответственных за вариации в соответствии с фенотипическими признаками, а кластерный анализ был использован для определения генетического расстояния между образцами.

Корреляции определялись с помощью компьютерной программы SPSS по следующей формуле:

$$r = \frac{\sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{(\sum x_i^2 - n \bar{x}^2)(\sum y_i^2 - n \bar{y}^2)}}$$

Здесь  $x$  и  $y$  означают отдельные символы, а  $n$  — примеры.

Кластерный анализ был выполнен с использованием программы SPSS. Этот анализ, основанный на методах Уорда и UPGMA, определяет генетическое расстояние между образцами и таким образом помещает генетически близкие образцы в единую группу. Результаты группировки описываются в виде дендрограммы с помощью кластерного анализа.

Кластерный анализ для экономических показателей UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) основан на евклидовом расстоянии (Rohlf F.J., 2004 [13]).

Название, происхождение и номера образцов чечевицы по каталогу

№	Название и номер образца чечевицы по каталогу	Происхождение	№	Название и номер образца чечевицы по каталогу	Происхождение
1	Flip2010-19	İCARDA	24	Flip2011-59	İCARDA
2	Flip2010-26	İCARDA	25	Flip2011-61	İCARDA
3	Flip2010-81	İCARDA	26	Flip2011-64	İCARDA
4	Flip2010-91	İCARDA	27	10932	
5	Flip2010-94	İCARDA	28	10946	
6	Flip2010-95	İCARDA	29	10939	
7	Flip2010-96	İCARDA	30	10943	
8	Flip2010-97	İCARDA	31	Flip2011-32	İCARDA
9	Flip2010-101	İCARDA	32	Flip2011-31	İCARDA
10	Flip2011-13	İCARDA	33	10928	
11	Flip2011-14	İCARDA	34	Flip2011-40	İCARDA
12	Flip2011-17	İCARDA	35	10937	
13	Flip2011-18	İCARDA	36	10940	
14	Flip2011-19	İCARDA	37	10926	
15	Flip2011-20	İCARDA	38	10925	
16	Flip2011-26	İCARDA	39	Flip2011-384	İCARDA
17	Flip2011-35	İCARDA	40	10942	
18	Flip2011-37	İCARDA	41	10934	
19	Flip2011-41	İCARDA	42	10929	
20	Flip2011-42	İCARDA	43	10930	
21	Flip2011-43	İCARDA	44	Flip2011-29	İCARDA
22	Flip2011-51	İCARDA	45	Flip2011-36	İCARDA
23	Flip2011-57	İCARDA	46	Jasmin	Азербайджан

### Результаты и обсуждение

Исследовались 46 образцов чечевицы разного происхождения, выращенные в условиях орошения в течение 3 лет на Апшеронской научно-исследовательской базе, и были изучены структурные элементы образцов. Полученные результаты были проанализированы с помощью статистических методов. Самым эффективным методом анализа показателей продуктивности служит вариационный анализ. Высота растения представляет собой наиболее чувствительный признак, подвергающийся влиянию окружающей среды и определяющий широкую вариацию. В наших исследованиях была зафиксирована высокая вариация по высоте растений

(27,0–44,7 см). Максимальная высота была зафиксирована в образцах Жасмин (44,7 см) и 10932 (43,3 см), а минимальная — в образцах Flip2010-81 (28,0 см) и Flip2010-96 (27,0 см).

В своем исследовании по образцам чечевицы Али Коч, изучив их фенологические и морфологические особенности, показал, что высота у растений составляла 44–55 см (Ali Koç, 2019 [9]), в то время как в Индии Гупта и его коллеги в своем исследовании чечевицы отметили, что высота у растений составляла 6,2–24,2 см (Gupta, 1996 [8]). Исходя из литературных источников, в целом изученные нами образцы можно назвать средне-высокими (32–36 см).

Таблица 2

**Степень вариации некоторых элементов продуктивности в образцах чечевицы**

Признаки	Мин.	Макс.	Среднее число, ±	Среднее квадратиче- ское отклонение	Статистическая значимость
Высота расположения 1-го боба, см	9,0	18,7	13,8±0,11	2,2	**
Высота растения, см	27,00	44,7	35,0±0,21	4,1	***
Число семян на растение, шт.	50,00	153,0	100,4±0,25	41,1	**
Кол-во бобов на растение, шт.	50,00	167,0	104,4±0,41	24,6	**
Масса 100 семян, г	2,50	5,2	3,6±0,15	0,6	***
Количество выходов, шт.	62,00	100,0	81,4±0,19	7,2	*

Примечание: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$

Резкая вариация наблюдалась в количестве бобов и семян (табл. 2). Таким образом, количество бобов на растении составляло 50,0–167,0, а количество семян на растение – 50,0–853,0. Наибольшее количество семян было отмечено в Flip2011-41 (167,0 шт.), 10943 (165,0 шт.), наименьшее количество зерен было отмечено в Flip2010-81 (50 шт.). Количество семян в 1 бобе обычно 1–2, в некоторых образцах – 3, а масса 100 семян колеблется в пределах 2,5–5,2 г.

Как было указано, масса 100 семян варьировала от 2,5 до 5,2 г. Самый низкий показатель этого признака

был отмечен у Flip2011-42 (2,5 г), а самый высокий – у образца Жасмин (5,2 г). Другие исследования показали, что масса 100 семян не зависит от воздействия окружающей среды и для разных генотипов колеблется в пределах 1,07–8,55 г (Beecher 2001 [3], Saxena M.C. 1981 [14], Seretoğlu H. 1994 [15]).

Для определения взаимосвязи между различными элементами продуктивности корреляционный анализ был рассчитан на основе трехлетних средних значений (табл. 3).

Таблица 3

**Корреляция показателей продуктивности образцов чечевицы (*Lens culinaris* Medik.)**

	Высота рас- положения 1-го боба	Высота растения	Количество семян на рас- тение	Количество бобов на рас- тении	Масса 100 семян	Количество выходов
Высота расположения 1-го боба	1	0,650**	0,119	0,250	0,318*	0,020
Высота растения		1	0,572**	0,471*	0,435*	0,140
Количество семян на растение			1	0,598**	0,093	0,080
Количество бобов на растении				1	0,247	0,089
Масса 100 семян					1	0,05
Количество выходов						1

Примечание: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$

Значимая положительная корреляция ( $p < 0,001$ ) была обнаружена между высотой растения и количеством бобов на растении, между количеством семян на растение и массой. Однако значимость этой корреляции варьирует. Хотя корреляция между высотой расположения 1-го боба и количеством семян на растение и количеством бобов на растении не является статистически значимой, существует очень значимая ( $p < 0,001$ ) положительная корреляция между этим признаком и высотой растения. В наших экспериментах положительная корреляция была зафиксирована между количеством семян на растение и количеством бобов, а также отрицательная корреляция ( $r = -0,093$ ) была отмечена между количеством семян на растение и массой 100 семян.

Это свидетельствует о том, что увеличение количества семян привело к уменьшению массы 100 семян.

Отрицательная корреляция между количеством семян и массой 100 семян выявлена также в других исследованиях (Beecher, 2001 [3], Chiftchi V., 2001 [6], Luthra, 1990 [10], Sozen, O., 2017 [16]). В своем исследовании Токлу и его коллеги (2009) отметили значимую взаимосвязь между количеством и массовыми признаками у семян местных генотипов чечевицы (Toklu, F., 2009 [17]). По сведениям из литературы, также установлено, что количество бобов на растении, количество зерен на растение, масса и высота расположения 1-го боба должны приниматься во внимание в качестве критериев селекции (Gunel E., 1993 [7], Gupta, 1996 [8], Saxena M.C., 1981 [14]).

В нашем исследовании не было обнаружено значимой корреляции между количеством выходов и исследованными показателями продуктивности (см. табл. 3).

Среди исследованных образцов чечевицы был проведен кластерный анализ и на основании изученных показателей продуктивности образцы были сгруппированы.

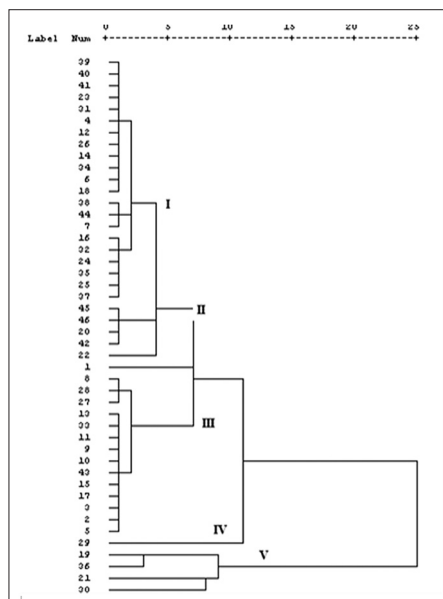


Рис. 1. Группирование генотипов чечевицы по морфологическим и количественным показателям, выращенных в 2013–2016 гг.

Анализ проводился на основании чисел в среднем за 3 года, результаты были описаны с помощью дендрограммы (рис. 1). Как видно из представленной дендрограммы, 46 изученных образцов чечевицы разного происхождения были объединены в 5 основных групп; при этом количество и происхождение генотипов, включенных в каждую группу, были разными (табл. 4).

Большая часть вариации между образцами была связана с количеством семян на растении. Кластерный анализ, основанный на этом показателе, позволяет разделить генотипы на группы по количеству семян. Согласно данным таблицы 4, кластер I является самой большой группой и объединяет 46% исследованных образцов. Образцы, принадлежащие к этой группе, можно оценить как короткорослые, среднеурожайные. 10929, Flip2011-42, Flip2011-57, Flip2011-36, Жасмин, включенные во 2-ю группу, были оценены как среднерослые и высокоурожайные образцы. 15 образцов, включенных в кластер III, относятся к группе среднерослых, средней урожайности, только один образец, включенный в кластер IV (10939), и 4 образца, включенные в кластер V (Flip2011-41, Flip2011-43, 10941, 10940), являются высокорослыми и имеют повышенное количество семян.

Таблица 4

**Вариация признаков в образцах чечевицы, сгруппированных в разные кластеры**

Кластер	Количество и происхождение генотипов, включенных в кластер	Высота растения, см	Высота расположения 1-го боба	Количество бобов на растении, шт.	Количество семян на растении, шт.	Масса 100 семян, г	Количество выходов
I	4, 6, 7, 12, 14, 16, 18, 23, 24, 25, 26, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 44	27,0–40,3	11,0–14,7	85,7–138,0	80,3–153,0	2,9–4,7	68–100
II	20, 22, 42, 45, 46	30,0–44,7	11,3–17,0	81,7–149,3	114,7–151,3	2,5–5,2	78–81
III	1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 26, 27, 33, 43	28,0–43,3	9,0–16,7	50,0–116,0	50,0–149,7	2,5–4,7	62–91
IV	29	41,0	16,3	81,3	133,3	3,4	92
V	19, 21, 30, 36	31,0–38,7	10,0–14,0	53,3–167,0	135,7–225,7	2,6–3,3	73–85
<b>Общее среднее значение</b>		<b>35,1</b>	<b>13,8</b>	<b>104,4</b>	<b>100,43</b>	<b>3,6</b>	<b>81,4</b>

**Заключение**

В результате анализа выявлено среднее ( $p < 0,01$ ) статистически значимое генетическое разнообразие среди 46 генотипов чечевицы, культивируемых по отдельным

морфологическим и количественным признакам. Среди генотипов из исследованных образцов 31% отмечены как высокоурожайные, 43% – среднеурожайные, 26% – низкоурожайные. Среди генотипов Flip2011-61, Flip2011-41, Flip2011-43, 10941, 10940, 10939, 10929

и Жасмин были оценены как наиболее перспективные образцы.

## Литература

1. Amirov L.A., Mirzaev R.Sh., Hasanova G.M., Mamedov Kh.I., Shikhalieva K.B., Babaeva S.M. Results of research and breeding of the lentil gene pool // Proceedings of the Azerbaijan Research Institute of Crop Husbandry. Baku: Muallim. — 2014. — Vol. 25. — P. 38–41.
2. Aydoğan A., Karagül V., Gyürbüz A. Effect of different sowing dates on yield and yield components of green and red lentils (*Lens culinaris* Medik.) // Biotech Studies. — 2008. — Vol. 17(1–2).
3. Beecher B.T., Toncher E. and Chakar D. Relationship between yield and yield elements of local lentil varieties in the Southeast Anatolia region / Turkey 4. Field Crops Congress, 2001. — P. 381–384.
4. Bukak B., Al V., Baisal I. and Polat T. Alternative varieties and lines of lentils / GAP III. Agricultural Congress, 2003. — P. 555–558.
5. Chehrali S. Fodder Grain legumes. — Faculty of Agriculture, University of Ankara Publications: 1089 Textbook: 314. — Ankara, 1988.
6. Chiftchi V. and Yulker M. Analysis of adaptation and stability of yield and some components of the yield of winter lentils // Ukurova Uni. Zir. Fac. Derg. — 2001. — Vol. 16. — P. 47–54.
7. Gunel E., Yilmaz N., Erman M., Kulaz H. Investigations of the phenological and morphological properties of lentils (*Lens culinaris* Medic.) under environmental conditions Wang // Journal of the Faculty of Agriculture of Yuzyuncu Yil University. — 1993. — Vol. 3(12). — P. 315–323.
8. Gupta A., Sinha M.K., Mani V.P., Dube S.D. Classification and genetic diversity in lentil germplasm // Lens Newsletter. — 1996. — Vol. 23. — Issue I/2. — P. 10–14.
9. Koç A., Akdeniz H. Determination of yield and technological characteristics of some red lentil (*Lens culinaris* Medik.) Genotypes in watery conditions of Beyazkule Ceylanpinar // Erciyes Journal of Agriculture and Animal Sciences ETHABD. — 2019. — Vol. 2. — No. 2. — P. 15–20.
10. Luthra S.K. and Sharma P.C. Correlation and path analysis in lentils // Lens Newsletter. — 1990. — Vol. 17. — No. 2. — P. 5–8.
11. Mirzaev R.S., Amirov L.A., Dzhahangirov A.A. Study of drought resistance of samples of food and leguminous crops // Proceedings of the Azerbaijan Research Institute of Crop Husbandry. Baku; Muallim. — 2014. — Vol. 25. — P. 152–155.
12. Montemurro F., Redana S., Viale G. et al. Eating beans may stave of breast cancer // Int. J. Cancer. — 2005. — Vol. 114. — P. 628–633.
13. Rohlf F.J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. — New York: Exeter. Publ., 2004. — 38 p. — P. 21–22.
14. Saxena M.C. Agronomy of lentils / In: C. Webb and G. Hawtin (eds.). Lentils. C.A.B., — London, UK, 1981. — P. 111–130.
15. Sepetoğlu H. Food Grain Legumes // Ege University Faculty of Agriculture Publications. Izmir. — 1994. — No. 24.
16. Sozen O., Karadavut U. Determination of the relationships between grain yield and yield components in some green lentil genotypes // Journal of Central Research Institute for Field Crops. — 2017. — Vol. 26(1). — P. 104–110. <https://doi.org/10.21566/tarbitderg.323605>.
17. Toklu F., Bicer B.T., Karakoy T. Agro-morphological characterization of the Turkish lentil landraces // African Journal of Biotechnology. — 2009. — Vol. 8(17). — P. 4121–4127.
18. Yusifov M.A. Plant growing. — Baku: Ganun, 2011. — P. 112–125.

## References

1. Amirov LA, Mirzaev RSh, Hasanova GM, Mamedov KhI, Shikhalieva KB, Babaeva SM. Results of research and breeding of the lentil gene pool. Proceedings of the Azerbaijan Research Institute of Crop Husbandry. Baku: Muallim 2014; 25:38–41.
2. Aydoğan A, Karagül V, Gyürbüz A. Effect of different sowing dates on yield and yield components of green and red lentils (*Lens culinaris* Medik.). Biotech Studies 2008; 17(1–2).
3. Beecher BT, Toncher E and Chakar D. Relationship between yield and yield elements of local lentil varieties in the Southeast Anatolia region. Turkey 4. Field Crops Congress, 2001:381–384.
4. Bukak B, Al V, Baisal I and Polat T. Alternative varieties and lines of lentils. GAP III. Agricultural Congress, 2003:555–558.
5. Chehrali S. Fodder Grain legumes. Faculty of Agriculture, University of Ankara Publications: 1089 Textbook: 314. Ankara, 1988.
6. Chiftchi V and Yulker M. Analysis of adaptation and stability of yield and some components of the yield of winter lentils. Ukurova Uni Zir Fac Derg 2001; 16:47–54.
7. Gunel E, Yilmaz N, Erman M, Kulaz H. Investigations of the phenological and morphological properties of lentils (*Lens culinaris* Medic.) under environmental conditions Wang. Journal of the Faculty of Agriculture of Yuzyuncu Yil University 1993; 3(12):315–323.
8. Gupta A, Sinha MK, Mani VP, Dube SD. Classification and genetic diversity in lentil germplasm. Lens Newsletter 1996; 23(I/2):10–14.
9. Koç A, Akdeniz H. Determination of yield and technological characteristics of some red lentil (*Lens culinaris* medik.) Genotypes in watery conditions of Beyazkule Ceylanpinar. Erciyes Journal of Agriculture and Animal Sciences ETHABD 2019; 2(2):15–20.
10. Luthra SK and Sharma PC. Correlation and path analysis in lentils. Lens Newsletter 1990; 17(2):5–8.

11. Mirzaev RS, Amirov LA, Dzhahangirov AA. Study of drought resistance of samples of food and leguminous crops. Proceedings of the Azerbaijan Research Institute of Crop Husbandry. Baku; Muallim 2014; 25:152–155.
12. Montemurro F, Redana S, Viale G et al. Eating beans may stave of breast cancer. Int J Cancer 2005; 114:628–633.
13. Rohlf FJ. NTSYS-*pc* numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Publ, 2004: 21–22.
14. Saxena MC. Agronomy of lentils. In: C Webb and G Hawtin (eds). Lentils. CAB, London, UK, 1981:111–130.
15. Sepetoğlu H. Food Grain Legumes. Ege University Faculty of Agriculture Publications. Izmir 1994, 24.
16. Sozen O, Karadavut U. Determination of the relationships between grain yield and yield components in some green lentil genotypes. Journal of Central Research Institute for Field Crops 2017; 26(1):104–110. doi: 10.21566/tarbitderg.323605.
17. Toklu F, Bicer BT, Karakoy T. Agro-morphological characterization of the Turkish lentil landraces. African Journal of Biotechnology 2009; 8(17):4121–4127.
18. Yusifov MA. Plant growing. Baku: Ganun, 2011: 112–125.

## CHARACTERISTIC OF THE ELEMENTS OF THE YIELD STRUCTURE OF LENTIL GENOTYPES BY STATISTICAL METHODS (*LENS CULINARIS* MEDIK.)

M.E. MAMEDOVA

*Institute of Genetic Resources of the National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan*

In the course of the study, a comparative study was carried out based on a structural analysis of some parameters of the productivity of new collections of lentils. In genotypes, average genetic differences were recorded for plant height, number of seeds in beans, number of beans per plant, and weight of 100 seeds. 31% of the studied samples were recognized as high-yielding, 43% – medium-yielding, and 26% – low-yielding. The genotypes Flip 2011-61, Flip 2011-41, Flip 2011-43, 10941, 10940, 10939, 10929 and Jasmine were evaluated as the most promising samples.

*Keywords:* lentils, yield, quality, correlation.

### **Address:**

Mamedova M.E.

Researcher, Department of Biochemistry, Institute of Genetic Resources, ANAS

Institute of Genetic Resources of ANAS, Baku, Azerbaijan

E-mail: shamsiye@bk.ru

### **Для цитирования:**

Мамедова М.Э. Характеристика элементов структуры урожайности генотипов чечевицы статистическими методами (*Lens culinaris* Medik.). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(3):17–23.

### **For citation:**

Mamedova M.E. Characteristic of the elements of the yield structure of lentil genotypes by statistical methods (*Lens culinaris* Medik.). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(3):17–23 (in Russian).

## ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДНОЙ ДИЕТЫ НА КИШЕЧНУЮ МИКРОФЛОРУ КРЫС В СОСТОЯНИИ ДИСБИОЗА

Е.В. СКВОРЦОВ\*, Рин.С. МУХАММАДИЕВ, Рин.С. МУХАММАДИЕВ,  
Л.Р. ВАЛИУЛЛИН, Ю.М. ТРЕМАСОВ, А.М. ТРЕМАСОВА

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), Казань

В результате добавок в корм лабораторных крыс антибиотика линкомицина в кишечнике крыс был стимулирован дисбиоз, приводивший к значительному увеличению количества *Clostridium difficile* и *Staphylococcus aureus*. Было проанализировано влияние корма, содержавшего лактозу и целлюлозу, на количество бактерий кишечной микрофлоры в состоянии дисбиоза. Исследовано также влияние этой углеводной диеты на рост массы тела крыс. При этом было показано, что углеводная диета изменяла микробный баланс в сторону доминирования нормальной кишечной микрофлоры. Это вызывало значительное уменьшение общей кишечной бактериальной массы и замедление роста массы тела животных.

**Ключевые слова:** микробное сообщество кишечника, линкомицин, дисбиоз, углеводная диета.

### Введение

Научно обоснованное применение антибиотиков в ветеринарии является оптимальным подходом для контроля и лечения бактериальных инфекций. Это необходимо для поддержания эффективности антибиотиков, предотвращения распространения антибиотикорезистентных бактерий и попадания таких бактерий в пищу человека. К тому же антибиотики плохо всасываются в кишечнике, поэтому большая их часть попадает в фекалии, что приводит к загрязнению почвы и окружающей среды [7, 9].

Применение антибиотиков вызывает дисбаланс кишечной микрофлоры, которая играет решающую роль в защите кишечника, обеспечивая устойчивость к колонизации и инфицированию патогенными организмами [14]. Нередко применение антибиотиков вызывает увеличение количества *Clostridium difficile*. Недавние оценки показывают, что в США каждый год инфекции *C. difficile* уносят жизни около 14000 человек и требуют более мил-

лиарда долларов медицинских расходов [3, 11]. Лечение антибиотиками является ключом как к инициации, так и к терапии инфекций *C. difficile*. Исследования в Европе показали, что 92% пациентов с диагнозом инфекции *C. difficile* сообщили об использовании антибиотиков в течение предыдущих 3 месяцев, причем цефалоспорины третьего поколения и линкомицин наиболее сильно коррелировали с последующей инфекцией *C. difficile* [4, 12].

В настоящем исследовании для генерации дисбиоза нами был применен линкомицин [13]. Цель работы: исследование влияния углеводной диеты на линкомицин-ассоциированный дисбиоз кишечника крыс.

При анализе состава кишечной микрофлоры исходили из того, что содержание бактерий, а значит, и их генов, в помете пропорционально их количеству в кишечнике. Определяли количество генов бактерий методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

### Материалы и методы

**Объект исследования.** Объектом исследования были белые беспородные крысы-самцы массой  $123 \pm 11$  г в начальном возрасте 8 недель. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

© 2021 г. Скворцов Е.В., Мухаммадиев Рин.С., Мухаммадиев Рин.С., Валиуллин Л.Р., Тремасов Ю.М., Тремасова А.М.

\* Автор для переписки:

Скворцов Евгений Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

E-mail: eskvortsov@rambler.ru



**Стимуляция дисбиоза.** Опытную группу, состоявшую из 10 крыс-самцов кормили ячменем и вводили перорально линкомицин в растворе с помощью зонда из расчета в сутки 60 мг/кг массы тела крысы. Введение линкомицина продолжалось 14 дней (9- и 10-недельный возраст). Контрольную группу, состоявшую из 10 крыс, кормили ячменем, но без линкомицина.

**Углеводная диета.** На 15-й день эксперимента опытная группа была переведена на углеводный корм. Углеводный корм готовили смешиванием равных масс лактозы и микрокристаллической целлюлозы. Смесь гранулировали. Содержание на углеводном рационе продолжалось 14 дней (11- и 12-я недельный возраст). Рацион контрольной группы оставался без изменений. Количества корма в рационах приведены в таблице 1.

Таблица 1

**Количество корма и антибиотиков**

Возраст, недели	Контрольная группа	Опытная группа	
	Ячмень грамм/сутки	Ячмень грамм/сутки	Линкомицин мг/кг×сутки
9	20	20	60
10	20	20	60
11	20	Углеводный корм грамм/сутки	
		20	
12	20	20	

**ПЦР реального времени с флуоресцентной детекцией.** ДНК выделяли с помощью набора реактивов «ДНК-сорб-В» (Интерлабсервис, Россия). В пробирки вносили по 100 мг усредненной пробы помета и 300 мкл лизирующего раствора, перемешивали и выдерживали 5 минут при 65 °С, периодически перемешивая. Далее центрифугировали пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 13,5 тыс. об./мин и использовали для экстракции ДНК надосадочную жидкость, которую переносили в новую пробирку и вносили в нее по 25 мкл сорбента. Перемешивали на вортексе, ставили в штатив на 2 мин, еще раз перемешивали и оставляли в штативе на 5 мин. Сорбент осаждали в пробирках при 10 тыс. об/мин. в течение 30 секунд. Надосадочную жидкость удаляли. ДНК, находящиеся на сорбенте, промывали 2 раза промывочными растворами. Далее осадок сорбента выдерживали при 65 °С в течение 10 мин для подсушивания.

Затем в пробирки вносили по 50 мкл ТЕ-буфера для растворения ДНК. Суспензию сорбента в ТЕ-буфере в пробирках перемешивали и помещали в термостат при 65 °С на 5 мин, периодически перемешивая. Потом пробирки центрифугировали 1 мин при 13,5 тыс. об./мин. Супернатант содержал растворенные, очищенные ДНК, готовые к ПЦР-РВ.

Содержание ДНК бактерий микрофлоры в пробах определяли набором «Колонофлор» (Альфалаб, Россия). Содержание ДНК бактерий кишечника выражали в lg ГЭ/г кала — в десятичных логарифмах ген-эквивалентов в 1 грамме кала.

Для ПЦР-РВ применяли амплификатор «CFX96» («Bio-Rad», США) с флуоресцентной детекцией.

**Измерение рН каловых проб.** Для измерения рН проб кал усредняли перемешиванием в фарфоровой ступке. Далее к 10 г усредненной пробы кала добавляли 10 мл дистиллированной воды, перемешивали и измеряли рН.

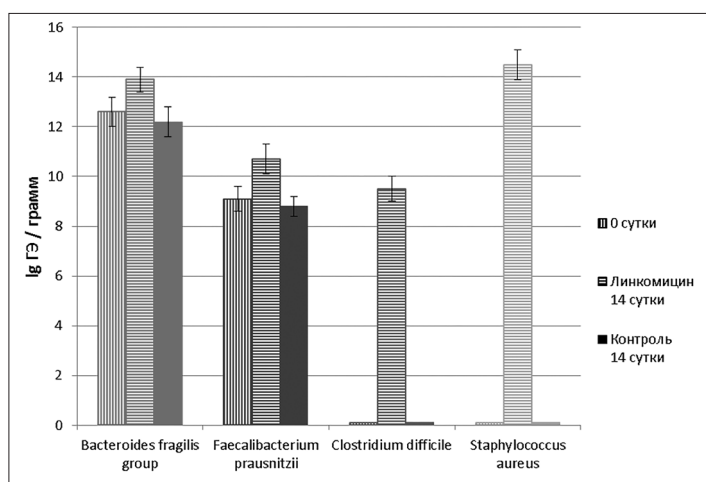
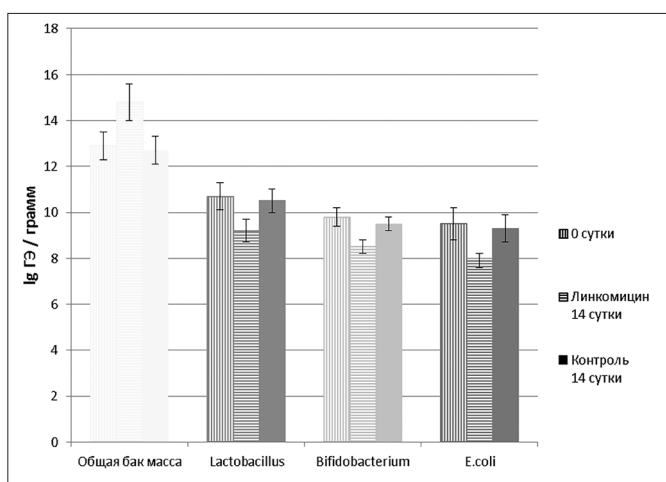
**Статистическая обработка.** Показатели определяли в трех повторностях. Полученные данные приведены в виде средних арифметических проанализированных повторов и их стандартных ошибок. Для обработки данных использовали программу Microsoft Excel. Достоверность различий сравниваемых средних арифметических величин устанавливали, применяя t-тест Стьюдента; при  $p < 0,05$  различия признавали значимыми.

**Результаты**

Содержание ДНК бактерий в кале опытной группы крыс до и после 2-недельного перорального введения линкомицина и контрольной группы представлено на рисунке 1.

В кале опытной группы, принимавшей линкомицин, на 14-е сутки определено повышенное количество общей бактериальной массы  $14,8 \pm 0,8$  lg ГЭ/г. Между тем содержание типичных представителей микрофлоры *E. coli*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. у опытной группы на 14-е сутки было меньше контрольной группы, но в норме (см. рис. 1). На 14-е сутки, в конце приема линкомицина в кале опытной группы было большое количество *Bacteroides fragilis* group —  $13,9 \pm 0,7$  lg ГЭ/г и *S. aureus* —  $14,4 \pm 0,5$  lg ГЭ/г, большое содержание *C. difficile* —  $9,4 \pm 0,9$  lg ГЭ/г.

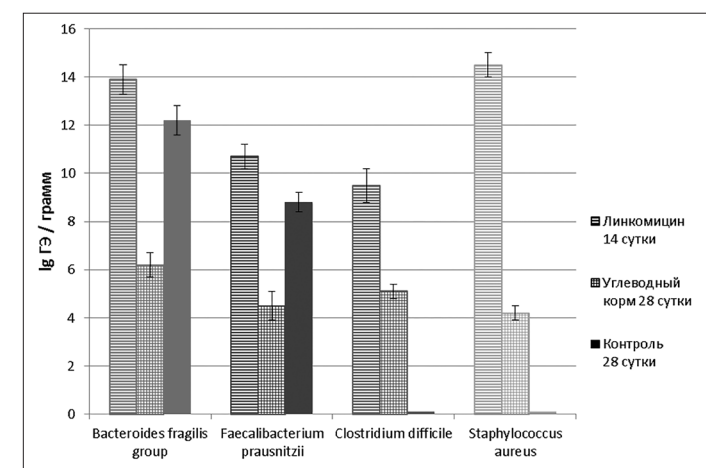
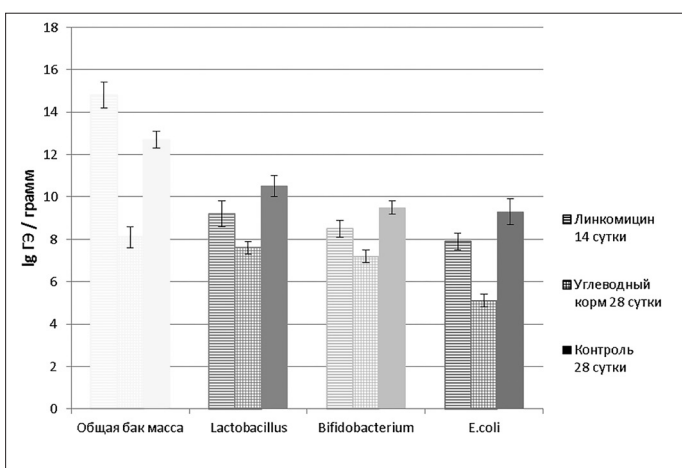
На 15-й день эксперимента опытная группа была переведена на углеводную диету. Содержание на углеводной диете продолжалось 14 дней.



а

б

Рис. 1а, б. Изменение количества бактерий кишечника при приеме линкомицина. Данные получены методом ПЦР-РВ, детекция – флуоресцентная (на левом (а) и правом (б) графиках приведены данные у разных видов бактерий)



а

б

Рис. 2а, б. Изменение количества бактерий кишечника при приеме углеводного корма, при линкомицин-ассоциированном дисбиозе. Данные получены методом ПЦР-РВ, детекция – флуоресцентная (на левом – а – и правом – б – графиках приведены данные у разных видов бактерий)

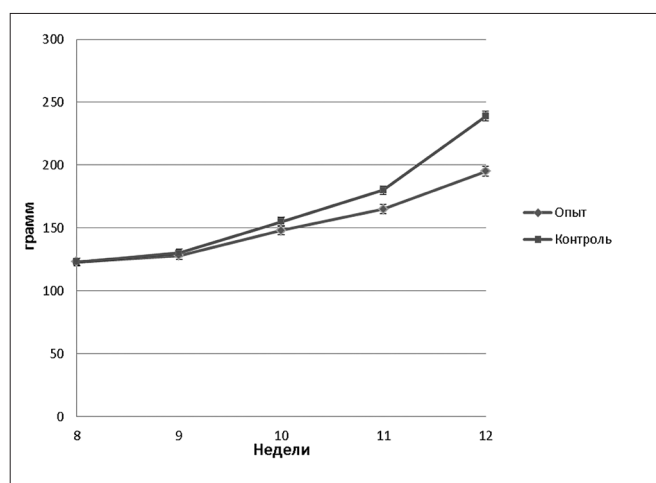
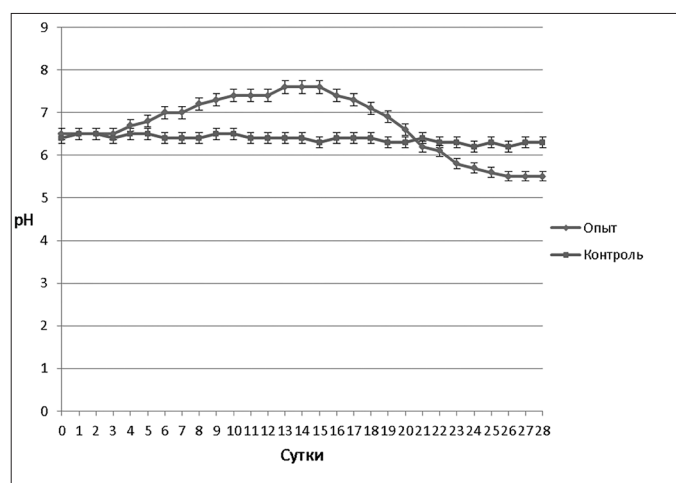


Рис. 3. Изменение рН кала лабораторных крыс в ходе эксперимента

Рис. 4. Рост массы тела крыс в процессе эксперимента

Углеводная диета приводила к резкому снижению общей бактериальной массы в фекалиях до  $8,1 \pm 0,5 \lg$  ГЭ/г, что значительно меньше в сравнении с контрольной группой (рис. 2). Уменьшалось содержание всех бактерий кишечной микрофлоры, но уменьшение количества *Lactobacillus* spp. до  $7,6 \pm 0,3 \lg$  ГЭ/г и *Bifidobacterium* spp. до  $7,2 \pm 0,3 \lg$  ГЭ/г можно считать незначительным в сравнении с уменьшением количества других исследованных бактерий. Количество *E. coli* уменьшалось до  $5,1 \pm 0,3 \lg$  ГЭ/г. Содержание *B. fragilis group* под воздействием углеводной диеты также снижалось до  $6,2 \pm 0,5 \lg$  ГЭ/г, и стало значительно ниже контроля. Содержание патогенных микробов *C. difficile* и *S. aureus* уменьшалось значительно: *C. difficile* — до  $5,1 \pm 0,3 \lg$  ГЭ/г, *S. aureus* — до  $4,2 \pm 0,6 \lg$  ГЭ/г.

В ходе эксперимента проводилось ежедневное измерение рН усредненных проб кала опытной и контрольной групп крыс (рис. 3). В начале эксперимента значение рН кала было  $6,52 \pm 0,11$ . Начиная с 4-го дня приема линкомицина, отмечено повышение рН кала опытной группы крыс. На 13-й день рН кала достигло значения  $7,6 \pm 0,13$ , в это время значение рН кала контрольной группы составляло  $6,4 \pm 0,11$ .

После перевода опытной группы крыс на углеводную диету, на 15-й день эксперимента значение рН кала опытной группы крыс стало снижаться. Снижение значения рН продолжалось до окончания эксперимента на 28-й день. В конце эксперимента значение рН кала опытной группы составляло  $5,5 \pm 0,10$ . При этом значение показателя рН кала контрольной группы в ходе эксперимента практически не менялось и находилось в диапазоне  $6,2–6,5$ .

На рисунке 4 приведены графики роста массы тела крыс экспериментальной и контрольной групп. Привес крыс опытной группы отставал от привеса крыс контрольной группы как при кормлении линкомицином, так и при кормлении углеводной диетой. В конце эксперимента средняя масса тела крыс контрольной группы была  $279 \pm 4,8$  г, тогда как средняя масса тела животных экспериментальной группы составляла  $195 \pm 4,9$  г.

### Обсуждение

Исследование показало, что воздействие линкомицина на микрофлору кишечника вызывает дисбиоз с сильным увеличением количества патогенных *C. difficile* и *S. aureus*. Инфекция *C. difficile* считается основной причиной колита [1] и поэтому очень опасна.

Полученные нами результаты подтвердили недавние исследования, которые показали, что неправильное

использование антибиотиков приводит к снижению численности основных видов кишечных микроорганизмов и доминированию в кишечнике патогенных бактерий [6], в том числе *C. difficile* [2, 5, 8, 10].

Содержание ДНК бактерий в помете контрольной группы, корма которой не содержали линкомицин, за время эксперимента практически не менялось, что говорит о том, что возникший в кишечнике экспериментальной группы дисбиоз является следствием применения антибиотика — линкомицина.

Далее нами было исследовано влияние углеводной диеты, содержащей лактозу и микрокристаллическую целлюлозу в равных количествах, на дисбиотическую микрофлору кишечника крыс. Результаты исследования продемонстрировали, что углеводная диета привела к резкому снижению общей кишечной бактериальной массы. В конце эксперимента общая бактериальная масса снизилась до  $8,1 \pm 0,5 \lg$  ГЭ/г, что значительно меньше в сравнении с контрольной группой (см. рис. 2), где этот показатель составил  $12,7 \pm 0,4 \lg$  ГЭ/г. Уменьшение количества микрофлоры кишечника вызвано дефицитом необходимых веществ в углеводной диете, необходимых для размножения бактерий, в частности, полным отсутствием азота и фосфора. Уменьшилось содержание всех бактерий кишечной микрофлоры, но уменьшение количества *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. было незначительным в сравнении с другими бактериями. Это может быть объяснено тем, что эти два рода бактерий наиболее приспособлены к ассимиляции лактозы. Содержание патогенных микробов *C. difficile* и *S. aureus* значительно уменьшилось. Таким образом, углеводная диета за 14 дней изменила микробный баланс в сторону доминирования нормальной кишечной микрофлоры *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. и резкому уменьшению количества патогенов *C. difficile* и *S. aureus*. Но при этом углеводная диета привела к резкому снижению общей бактериальной массы и уменьшению количества всех бактерий кишечной микрофлоры.

Измерение рН проб кала крыс в процессе приема линкомицина установило увеличение рН кала опытной группы крыс в сравнении с контрольной. В последний день приема линкомицина показатель рН усредненной пробы кала опытной группы крыс составлял  $7,6 \pm 0,13$ , а рН кала контрольной группы составлял  $6,4 \pm 0,11$  (см. рис. 3).

На 15-й день эксперимента, после перевода опытной группы крыс на углеводную диету, значение показателя рН кала опытной группы крыс стало снижаться. Снижение значения рН кала опытной группы продолжалось до окон-

чения эксперимента. В конце эксперимента на 28-й день значение рН кала опытной группы составляло  $5,5 \pm 0,10$ . Показатель рН кала контрольной групп в ходе эксперимента практически не менялся, и в конце эксперимента на 28-й день значение рН кала крыс контрольной группы было  $6,3 \pm 0,11$ . Слабокислый показатель рН усредненной пробы кала обеспечивается нормальной микрофлорой, прежде всего, лактобактериями и бифидобактериями, которые в результате углеводной диеты оказались преобладающими микроорганизмами в кишечнике. Они вырабатывают кислые метаболиты — главным образом молочную кислоту из лактозы, уменьшая рН в кишечнике. И таким образом лактобактерии и бифидобактерии создают неблагоприятные условия для условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, при которых они не могут размножаться. Поэтому клостридии и стафилококки в конце эксперимента составляли всего около 1% от количества бифидобактерий и лактобактерий.

Однако привес крыс опытной группы, содержащихся на углеводной диете, был ниже, чем у крыс контрольной группы. Причем, в конце кормления линкомицином средняя масса тела крыс экспериментальной группы была меньше на 4,5% в сравнении с контрольной, а в конце эксперимента после углеводной диеты была меньше на 18,4%. Это свидетельствует о том, что углеводная диета не решает все проблемы. И хотя она изменила микробный баланс в сторону доминирования нормальной кишечной микрофлоры *Bifidobacterium* spp, и *Lactobacillus* spp., однако вызвала резкое снижение общей кишечной бактериальной массы, по причине дефицита необходимых для роста кишечных бактерий веществ в углеводной диете. Также в углеводной диете нет белков, фосфора и других веществ, необходимых для роста крыс. Все это в конечном итоге привело к отставанию в росте массы тела крыс опытной группы, в сравнении с крысами контрольной группы.

### Заключение

Таким образом, методом ПЦР-РВ нами было проанализировано влияние корма, содержавшего лактозу и целлюлозу, на количество основных кишечных бактерий в состоянии дисбиоза. Исследовано влияние этой углеводной диеты на рост массы тела крыс. Исследования показали, что углеводная диета, хотя и изменила микробный баланс в сторону доминирования нормальной кишечной микрофлоры, но привела к резкому уменьшению общей кишечной бактериальной массы и к замедлению роста массы тела крыс.

### Литература

1. Bartlett J.G., Onderdonk A.B., Cisneros R.L., Kasper D.L. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters // *J. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 190. — P. 202–209.
2. Dubberke E.R., Reske K.A., Yan Y., Olsen M.A., McDonald L.C., Fraser V.J. *Clostridium difficile*-associated disease in a setting of endemicity: identification of novel risk factors // *Clin. Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 45. — P. 1543–1549.
3. Feuerstadt P., Das R., Brandt L.J. The evolution of urban *C. difficile* infection (CDI): CDI in 2009–2011 is less severe and has better outcomes than CDI in 2006–2008 // *Am. J. Gastroenterol.* — 2014. — Vol. 109. — P. 1265–1276.
4. Garey K.W., Sethi S., Yadav Y., DuPont H.L. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection // *J. Hosp. Infect.* — 2008. — Vol. 70. — P. 298–304.
5. Kazakova S.V., Ware K., Baughman B., Bilukha O., Paradis A., Sears S. A hospital outbreak of diarrhea due to an emerging epidemic strain of *Clostridium difficile* // *Arch. Intern. Med.* — 2006. — Vol. 166. — P. 2518–2524.
6. Kim S., Covington A., Pamer E.G. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens // *Immunol. Rev.* — 2017. — Vol. 279. — P. 90–105.
7. Kim K.R., Owens G., Kwon S.I., So K.H., Lee D.B., Ok Y.S. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment // *Water, Air, Soil Pollution.* — 2011. — Vol. 214. — P. 163–174.
8. Loo V.G., Poirier L., Miller M.A., Oughton M., Libman M.B., Michaud S. A predominately clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353. — P. 2442–2449.
9. Ok Y.S., Kim S.C., Kim K.R., Lee S.S., Moon D.H., Lim K.J., Sung J.K., Hur S.O., Yang J.E. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province // *Korea. Environmental Monitoring and Assessment.* — 2011. — Vol. 174. — P. 693–701.
10. Owens R.C., Donskey C.J., Gaynes R.P., Loo V.G., Muto C.A. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection // *Clin. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 46. — P. 19–31.
11. Pépin J., Valiquette L., Alary M.E., Villemure P., Pelletier A., Forget K., Pépin K., Chouinard D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity // *CMAJ.* — 2004. — Vol. 171. — P. 466–472.
12. Slimings C., Riley T.V. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2014. — Vol. 69. — P. 881–891.
13. Spižek J., Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications // *Biochem. Pharmacol.* — 2017. — Vol. 133. — P. 20–28.

14. Theriot C.M., Young V.B. Microbial and metabolic interactions between the gastrointestinal tract and *Clostridium difficile* infection // Gut Microbes. – 2014. – Vol. 5. – P. 86–95.

## References

1. Bartlett JG, Onderdonk AB, Cisneros RL, Kasper DL. Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J Infect Dis* 2004; 190:202–209.
2. Dubberke ER, Reske KA, Yan Y, Olsen MA, McDonald LC, Fraser VJ. *Clostridium difficile*-associated disease in a setting of endemicity: identification of novel risk factors. *Clin Infect Dis* 2007; 45:1543–1549.
3. Feuerstadt P, Das R, Brandt LJ. The evolution of urban *C. difficile* infection (CDI): CDI in 2009–2011 is less severe and has better outcomes than CDI in 2006–2008. *Am J Gastroenterol* 2014; 109:1265–1276.
4. Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 2008; 70:298–304.
5. Kazakova SV, Ware K, Baughman B, Bilukha O, Paradis A, Sears S. A hospital outbreak of diarrhea due to an emerging epidemic strain of *Clostridium difficile*. *Arch Intern Med* 2006; 166:2518–2524.
6. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev* 2017; 279:90–105.

7. Kim KR, Owens G, Kwon SI, So KH, Lee DB, Ok YS. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water, Air, Soil Pollution* 2011; 214:163–174.
8. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MB, Michaud S. A predominately clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005; 353:2442–2449.
9. Ok YS, Kim SC, Kim KR, Lee SS, Moon DH, Lim KJ, Sung JK, Hur SO, Yang JE. Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province. Korea. *Environmental Monitoring and Assessment* 2011; 174:693–701.
10. Owens RC, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto CA. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46:19–31.
11. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pépin K, Chouinard D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 2004; 171:466–472.
12. Slimings C, Riley TV. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:881–891.
13. Spížek J, Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochem Pharmacol* 2017; 133:20–28.
14. Theriot CM, Young VB. Microbial and metabolic interactions between the gastrointestinal tract and *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 2014; 5:86–95.

## INFLUENCE OF CARBOHYDRATE DIET ON INTESTINAL MICROFLORA IN RATS IN THE STATE OF DYSBIOSIS

E.V. SKVORTSOV, Rish. S. MUKHAMMADIEV, Rin. S. MUKHAMMADIEV,  
L.R. VALIULLIN, Yu.M. TREMASOV, A.M. TREMASOVA

*Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan*

As a result of the addition of the antibiotic lincomycin to the food of laboratory rats, dysbiosis was stimulated in the intestines of rats, leading to a significant increase in the number of *Clostridium difficile* and *Staphylococcus aureus*. We analyzed the effect of food containing lactose and cellulose on the number of bacteria in the intestinal microflora in a state of dysbiosis. The effect of this carbohydrate diet on weight gain in rats was also investigated. It was shown that the carbohydrate diet changed the microbial balance towards the dominance of normal intestinal microflora. This caused a significant decrease in the total intestinal bacterial mass and a slowdown in the growth of animals body mass.

*Keywords:* intestinal microbial community, lincomycin, dysbiosis, carbohydrate diet.

### Address:

Skvortsov E.V., Ph.D.

Senior Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety» (FGBNU «FCTRB-VNIVI»)

E-mail: eskvortsov@rambler.ru

**Для цитирования:**

Скворцов Е.В., Мухаммадиев Риш.С., Мухаммадиев Рин.С., Валиуллин Л.Р., Тремасов Ю.М., Тремасова А.М. Влияние углеводной диеты на кишечную микрофлору крыс в состоянии дисбиоза. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(3):24–30.

**For citation:**

Skvortsov E.V., Mukhammadiev Rish. S., Mukhammadiev Rin. S., Valiullin L.R., Tremasov Yu.M., Tremasova A.M. Influence of carbohydrate diet on intestinal microflora in rats in the state of dysbiosis. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(3):24–30 (in Russian).

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ИМБРИЦИНА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *STREPTOMYCES IMBRICATUS*

И.А. КРАСОВИЦКАЯ\*, Н.В. КОТОВА, А.В. ГУСЕВ

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет  
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург

Данная статья посвящена разработке технологии выделения и очистки антибиотика немедицинского назначения имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*. Имбрицин является перспективным антибиотиком для применения в сельском хозяйстве, пищевой промышленности и в борьбе с микоповреждениями бумаги ввиду широкого спектра противогрибкового действия, а также ряда других положительных качеств, в том числе экологической безопасности.

**Ключевые слова:** неполиеновые антибиотики, имбрицин, культуральная жидкость, *Streptomyces imbricatus*, фильтрация, экстрагирование, выпаривание, кристаллизация.

### Введение

Имбрицин является представителем группы противогрибковых неполиеновых макролидных антибиотиков немедицинского назначения [1]. Продуцентом имбрицина является актиномицет *Streptomyces imbricatus*. Рассматривая возможности применения имбрицина, следует выделить ряд его положительных свойств, таких как стабильность, высокая биологическая активность, широкий спектр противогрибкового действия, низкая токсичность, а также легкая и быстрая деградация до нетоксичных соединений, практически не оставляющих ядовитых остатков в окружающей среде [4].

Имбрицин может быть использован в сельском хозяйстве, потому что оказывает фунгицидное действие в отношении ряда фитопатогенных грибов [1, 14], гербицидное действие на некоторые виды сорных растений [1], а также стимулирует защитные функции и выступает одним из регуляторов роста сельскохозяйственных культур. Перспективным с точки зрения экологии направлением является применение антибиотиков немедицинского назначения в качестве биоцидов для борьбы с микоповреждениями бумаги. Антибиотики в данном случае выступают как альтернатива препаратам, получаемым химическим синтезом [11]. Показана возможность применения для этих целей имбрицина как в индивидуальном

виде, так и в композиции с другими противомикробными препаратами [2, 9, 10]. Высокая противогрибковая активность, стабильность, нетоксичность и нелетучесть имбрицина позволяют использовать его в качестве консерванта в пищевой промышленности [6–8].

Несмотря на то, что имбрицин был впервые выделен еще в 1960-х годах [13], в настоящее время отсутствуют производства, занимающиеся выпуском субстанции этого антибиотика. Однако описанные выше свойства имбрицина и широкие возможности его практического применения свидетельствуют о перспективности разработки технологии, одной из важнейших стадий которой представляется выделение имбрицина из культуральной жидкости.

Цель настоящего исследования состоит в разработке технологии выделения имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*. В задачи работы входило изучение распределения имбрицина между мицелием и нативным раствором в культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*, изучение фильтрационных характеристик культуральной жидкости, подбор условий и осуществление процессов экстракции, выпаривания, кристаллизации и сушки для получения субстанции имбрицина.

### Материалы и методы

Для получения имбрицина в данной работе использовали штамм *Streptomyces imbricatus* ЛИА-0112, полученный из музея культур микроорганизмов кафедры биотехнологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета. Предвари-

© 2021 г. Красовицкая И.А., Котова Н.В., Гусев А.В.

\* **Автор для переписки:**

Красовицкая Ирина Александровна,  
старший преподаватель кафедры биотехнологии  
ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.  
E-mail: Krasovizkaya.Irina@pharminnotech.com

тельно подготовленный посевной материал вносили в оптимизированную питательную среду № 135: кукурузная мука — 40 г/л, соевая мука — 20 г/л, глюкоза — 50 г/л, рН=7,2–7,4, объем среды — 30 мл. Ферментацию проводили в колбах объемом 750 мл, установленных на качалочную платформу, при частоте оборотов 200–220 мин<sup>-1</sup> в течение 4 суток (96 ч) и температуре 26–28 °С.

По окончании процесса культивирования осуществляли фильтрацию культуральной жидкости на нутч-филт্রে, состоящем из вакуумного насоса Microsart (Sartorius), колбы Бунзена и воронки Бюхнера. Для улучшения фильтрационных характеристик культуральной жидкости и коагуляции белковых примесей проводили предварительную обработку следующими методами: тепловая коагуляция (выдерживание культуральной жидкости при температуре 40 °С в течение 15 мин); кислотная коагуляция (выдерживание культуральной жидкости при рН=4,0–4,5 в течение 15 мин); обработка полиэлектролитом (использовали полиэлектролит АВ-17, обработку проводили при постоянном перемешивании на шейкере Certomat MO II — Sartorius — в течение 30 мин); обработка неорганическими электролитами (использовали соли CaCl<sub>2</sub> и Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, обработку проводили при постоянном перемешивании на шейкере Certomat MO II — Sartorius — в течение 30 мин). Определяли величины общего сопротивления фильтрации и динамической вязкости культуральной жидкости в каждом из методов, а также содержание антибиотика в нативном растворе и мицелии после их разделения.

Имбрицин выделяли из мицелия методом экстрагирования. В качестве экстрагентов использовали: этиловый и изопропиловый спирты, ацетон и диметилформамид (ДМФА) в концентрациях 50, 65, 80, 100% при соотношении объёмов фаз экстрагента и мицелия 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, продолжительности процесса 15, 30, 45, 60 мин и температуре 20–22 °С. В экстрактах определяли содержание антибиотика.

Концентрирование экстракта имбрицина проводили под вакуумом при температуре 40–42 °С. В полученном концентрате определяли содержание имбрицина.

Концентрат имбрицина выдерживали 2–3 ч при температуре 4–5 °С и периодическом перемешивании. По прохождении этого времени полученные кристаллы отделяли на нутч-филт্রে, промывали холодным ацетоном и высушивали в течение 24 ч при температуре 22–25 °С. Во всех партиях получаемой субстанции определяли удельную активность имбрицина.

Содержание (активность, А, мкг/мл) имбрицина в нативном растворе, мицелии, экстрактах и концентрате

определяли по методике, описанной в [3], включающей в себя экстракцию имбрицина из исследуемого материала 65% изопропиловым спиртом и определение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр») при длинах волн 240 и 270 нм. В качестве раствора сравнения использовали 96% этиловый спирт. Удельную активность нистатина в субстанции определяли химическим (спектрофотометрическим) и биологическим методами [3, 5].

Проведена статистическая обработка всех экспериментальных данных, в разделе «Результаты и обсуждение» указаны значения с соответствующими доверительными интервалами, рассчитанными по критерию Стьюдента. Все эксперименты проводились не менее, чем в трех повторностях. Для подтверждения воспроизводимости и достоверности результатов рассчитывали стандартное отклонение среднего результата и контрольный критерий однородности выборки. Значение доверительной вероятности составило 0,95.

## Результаты и обсуждение

Для осуществления процесса выделения имбрицина из культуральной жидкости необходимо было выяснить, где преимущественно локализуется антибиотик: в нативном растворе или мицелии. Результаты исследования представлены на рисунке 1.

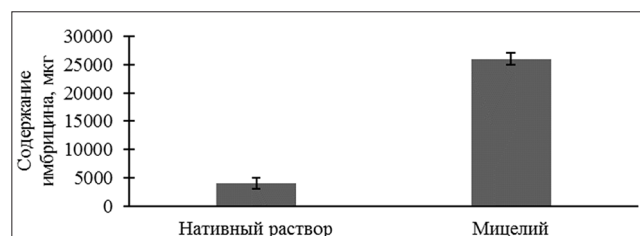


Рис. 1. Распределение имбрицина между нативным раствором и мицелием

Показано, что имбрицин преимущественно накапливается в мицелии (87% от всего количества антибиотика).

Культуральная жидкость представляет собой сложную, многокомпонентную, плохо фильтруемую систему переменного состава. В связи с этим для улучшения фильтрационных характеристик был проведен сравнительный анализ различных методов предварительной обработки культуральной жидкости (тепловая коагуляция, кислотная коагуляция, с использованием неорганических электролитов и полиэлектролита). Результаты экспериментов представлены в таблице 1.



Таблица 1

**Влияние методов предварительной обработки на фильтрационные характеристики культуральной жидкости**

№ п/п	Вид обработки	Динамическая вязкость культуральной жидкости, Па·с·10 <sup>3</sup>	Общее сопротивление процесса фильтрации, 1/м
1	Без обработки	4,02±0,27	(1,446±0,098)·10 <sup>14</sup>
2	Тепловая коагуляция	3,67±0,31	(1,938±0,086)·10 <sup>13</sup>
3	Кислотная коагуляция	3,91±0,33	(1,305±0,091)·10 <sup>14</sup>
4	Обработка неорганическими электролитами	3,97±0,21	(1,274±0,079)·10 <sup>14</sup>
5	Обработка полиэлектролитом	3,92±0,32	(1,351±0,096)·10 <sup>14</sup>

Установлено, что большинство методов предварительной обработки не дает значительного снижения времени фильтрации культуральной жидкости. Однако эффективным методом оказалась тепловая коагуляция в течение 15 минут при температуре 40 °С, позволившая снизить сопротивление фильтрации на 1 порядок. Активность имбрицина в мицелии после проведения тепловой коагуляции и фильтрации составила 18870±346 мкг/г.

**Изучение процесса экстрагирования имбрицина из мицелия.** В качестве экстрагентов для выделения имбрицина из мицелия были выбраны этиловый спирт, изопропиловый спирт, диметилформамид и ацетон. Однако в начале проведения экспериментов было установлено, что граница пропускания ДМФА – 260 нм, ацетона – 320 нм [12], что препятствует определению антибиотика в экстракте спектрофотометрическим методом, так как он подразумевает измерение оптической плотности раствора при 240 и 270 нм. Поэтому использование этих двух растворителей в качестве экстрагентов оказалось невозможным. Результаты исследований представлены на рисунке 2.

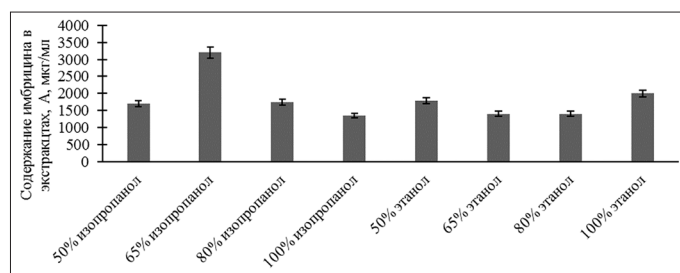


Рис. 2. Зависимость содержания имбрицина в экстракте от используемого экстрагента

Из этого рисунка видно, что наиболее эффективным экстрагентом является 65% раствор изопропилового спирта ( $A=3224\pm157$  мкг/мл).

Результаты исследований по подбору соотношения объёмов мицелия и экстрагента приведены на рисунке 3.

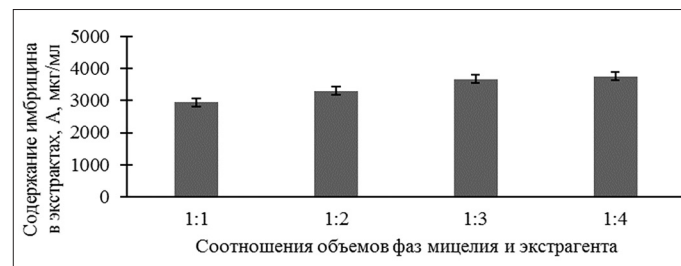


Рис. 3. Зависимость содержания имбрицина в экстракте от соотношения объёмов фаз

Полученные данные свидетельствуют о том, что оптимальным соотношением объёмов фаз мицелия и экстрагента является 1:3, так как при дальнейшем увеличении объёма экстрагента происходит разбавление целевого продукта при незначительном повышении выхода, что значительно усложняет процесс дальнейшего концентрирования антибиотика.

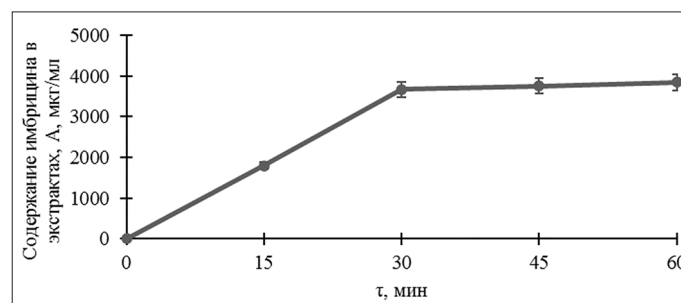


Рис. 4. Кинетика процесса экстракции имбрицина из мицелия

Исследование кинетики процесса экстракции имбрицина из мицелия (рис. 4) показало, что оптимальная продолжительность процесса составляет 30 мин. Дальнейшее увеличение длительности экстрагирования не оказывает существенного влияния на выход целевого продукта.

Для проведения процесса кристаллизации полученные экстракты упаривались в 2,5–3 раза ( $A=5051\pm384$  мкг/мл).

**Кристаллизация имбрицина из упаренного раствора и сушка кристаллов.** В полученных партиях субстанции антибиотика была определена удельная активность двумя методами (химическим и биологическим), которая составила 855±33 мкг/мг. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2  
Удельная активность различных партий  
субстанции имбрицина

Номер партии	Удельная активность $\gamma$ , мкг/мг	
	Химический метод	Биологический метод
1	892,2±21,2	873,1±28,2
2	866,3±16,1	841,3±30,2
3	883,1±25,2	850,1±35,1
Среднее значение	880,5±20,8	854,8±31,2

Общий выход имбрицина по предлагаемой технологии составил 30 %.

### Заключение

1. Установлено, что имбрицин преимущественно локализуется внутри клеток продуцента (87% от общего количества антибиотика).

2. Показано, что наиболее эффективным методом предварительной обработки культуральной жидкости является тепловая коагуляция при температуре 40 °С в течение 15 мин, позволяющая снизить сопротивление фильтрации на 1 порядок ( $(1,938 \pm 0,086) \cdot 10^{13}$  1/м).

3. Установлено, что наиболее эффективным экстрагентом является 65% водный раствор изопропилового спирта. Оптимальные условия проведения экстракции: соотношение фаз — 1:3, продолжительность процесса — 30 минут.

4. Определена удельная активность полученной субстанции имбрицина химическим и биологическим методами. Средняя величина удельной активности составляет  $854,8 \pm 31,2$  мкг/мг.

5. Общий выход имбрицина в процессе выделения и очистки по предлагаемой схеме составил 30%.

### Литература

- Белахов В.В., Яковлева Е.П., Колодяжная В.А., Бойкова И.В. Противогрибковый антибиотик немедицинского назначения имбрицин: получение, физико-химические свойства, структурные особенности и применение в промышленности и сельском хозяйстве: обзор // Экологическая химия. — 2017. — Т. 26. — № 5. — С. 233–248.
- Кузикова И.Л., Медведева Н.Г. Экологически безопасный комплексный препарат АРТДЕЗ для защиты объектов культурного наследия от биоповреждений // Региональная экология. — 2017. — № 3(49). — С. 79–81. doi: 10.30694/1026-5600-2017-3-79-81.
- Малков М.А., Полатовская О.Г. Лабораторный регламент № 270 на производство имбрицина. — Л.: ВНИТИАФ, 1989. — 128 с.
- Медведева Н.Г., Грднева Ю.А., Сухаревич М.Э. и др. Влияние имбрицина на рост и физиологические признаки целлюлозоразрушающих микромицетов // Микология и фитопатология. — 1996. — Т. 30. — № 3. — С. 43–47.
- Общая фармакопейная статья «Определение анти-микробной активности антибиотиков методом диффузии в агар»: ОФС.1.2.4.0010.18 / XIV Государственная фармакопея Российской Федерации. — М., 2018. — Т. 1. — С. 1272–1304. — Электронный ресурс. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0010-15-opredelenie-antimikrobnj-aktivnosti-antibiotikov-metodom-diffuzii-v-agar> (дата обращения: 01.06.2020).
- Патент № 2007924 Российская Федерация. МПК А23С 19/16. Защитный состав для покрытия сыра: № 4939230/13; заявл. 24.05.1991; опубл. 28.02.1994 / Снежко А.Г., Борисова Э.С., Роздов И.А. и др.; заявитель — Московский институт прикладной биотехнологии. — 9 с. — Электронный ресурс. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/64/75/a8/c962d45e1433ac/RU2007924C1.pdf> (дата обращения: 29.05.2020).
- Патент № 2170025 Российская Федерация. МПК А23С 19/16, А23В 4/02. Состав для защиты поверхности сыра и способ ее защиты: № 99126802/13; заявл. 27.12.1999; опубл. 10.07.2001 / Снежко А.Г., Кузнецова Л.С., Борисова Э.С., Холодова А.П.; заявитель — Снежко А.Г., Кузнецова Л.С., Борисова Э.С., Холодова А.П. — 5 с. — Электронный ресурс. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a1/b0/81/5758ea1bfb5b54/RU2170025C1.pdf> (дата обращения: 29.05.2020).
- Патент № 2403794 Российская Федерация. МПК А23С 19/16 (2006.01). Состав для защиты поверхности сыра от плесневения: № 2009100136/10; заявл. 12.01.2009; опубл. 20.07.2010 / Феофилова Е.П., Галанина Л.А., Сергеева Я.Э. и др.; заявитель — Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. — 6 с. — Электронный ресурс. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/32/fe/c1/edb904e646707f/RU2403794C2.pdf> (дата обращения: 29.05.2020).
- Патент № 2580759 Российская Федерация. МПК А61L 2/16 (2006.01). Биоцидное средство: № 2014153173/15; заявл. 25.12.2014; опубл. 10.04.2016 / Кузикова И.Л., Медведева Н.Г., Первак В.Э.; заявитель — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук (НИЦЭБ РАН). — 9 с. — Электронный ресурс. URL: [http://www.freepatent.ru/images/img\\_patents/2/2580/2580759/patent-2580759.pdf](http://www.freepatent.ru/images/img_patents/2/2580/2580759/patent-2580759.pdf) (дата обращения: 29.05.2020).
- Патент № 94027109 Российская Федерация. МПК D21Н 21/36 (1995.01). Способ изготовления биостойкой бумаги (варианты): № 94027109/12; заявл. 18.07.1994; опубл. 10.11.1995 / Добрусина С.А., Сухаревич В.И., Лоцманова Е.М. и др.; заявитель Научно-исследовательский

- центр экологической безопасности РАН. — 4 с. — Электронный ресурс. URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU94027109A1\\_19951110](https://yandex.ru/patents/doc/RU94027109A1_19951110) (дата обращения: 29.05.2020).
11. Сухаревич В.И., Кузикова И.Л., Медведева Н.Г. Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. — СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2009. — 207 с.
  12. Товбис М.С. Методы анализа и идентификации органических соединений: описание практических работ для аспирантов направления 04.06.01 «Химические науки» направленности «Органическая химия», очной и заочной форм обучения. — Красноярск: СибГУ им. М.Ф. Решетнева, 2019. — 35 с.
  13. Цыганов В.А., Конев Ю.В., Барашкова Н.П. [и др.]. Образование антибиотиков типа азаломицина F культурой *Actinomyces imbricatus* n. sp. // Антибиотики. — 1970. — Т. 15. — № 3. — С. 208–212.
  14. Шенин Ю.Д., Белых В.В., Рожкова Н.Г. Фунгицидная активность имбрицина и его солей // Антибиотики и химиотерапия. — 1996. — Т. 41. — № 6. — С. 21–24.
- ## References
1. Belakhov VV, Yakovleva YeP, Kolodyaznaya VA, Boykova IV. Protivogribkovyy antibiotik nemeditsinskogo naznacheniya imbritsin: polucheniye, fiziko-khimicheskiye svoystva, strukturnyye osobennosti i primeneniye v promyshlennosti i sel'skom khozyaystve: obzor. *Ekologicheskaya khimiya* 2017; 26(5):233–248 (in Russian).
  2. Kuzikova IL, Medvedeva NG. Ekologicheski bezopasnyy kompleksnyy preparat ARTDEZ dlya zashchity ob'yektov kul'turnogo naslediya ot biopovrezhdeniy. *Regional'naya ekologiya* 2017; 3(49):79–81. doi: 10.30694/1026-5600-2017-3-79-81 (in Russian).
  3. Malkov MA, Polatovskaya OG. Laboratornyy reglament № 270 na proizvodstvo imbritsina. Leningrad: VNITIAF, 1989: 128 (in Russian).
  4. Medvedeva NG, Gridneva YuA, Sukharevich ME [i dr]. Vliyaniye imbritsina na rost i fiziologicheskiye priznaki tsellyulozorazrushayushchikh mikromitsetov. *Mikologiya i fitopatologiya* 1996; 30(3):43–47 (in Russian).
  5. Obshchaya farmakopeynaya stat'ya «Opredeleniye antimikrobnoy aktivnosti antibiotikov metodom diffuzii v agar»: OFS.1.2.4.0010.18. XIV Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. Moscow, 2018; 1:1272–1304. URL: <https://pharmacopeia.ru/ofs-1-2-4-0010-15-opredelenie-antimikrobnoy-aktivnosti-antibiotikov-metodom-diffuzii-v-agar> (data obrashcheniya: 01.06.2020) (in Russian).
  6. Patent № 2007924 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A23S 19/16. Zashchitnyy sostav dlya pokrytiya syra: № 4939230/13; zayavl 24.05.1991; opubl 28.02.1994. Snezhko AG, Borisova ZS, Rozdov IA [i dr]; zayavitel' Moskovskiy institut prikladnoy biotekhnologii. 9 p. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/64/75/a8/c962d45e1433ac/RU2007924C1.pdf> (data obrashcheniya: 29.05.2020) (in Russian).
  7. Patent № 2170025 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A23C 19/16, A23V 4/02. Sostav dlya zashchity poverkhnosti syra i sposob yeye zashchity: № 99126802/13; zayavl 27.12.1999; opubl 10.07.2001. Snezhko AG, Kuznetsova LS, Borisova ZS Kholodova AP; zayavitel' Snezhko AG, Kuznetsova LS, Borisova ZS Kholodova AP. 5 p. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a1/b0/81/5758ea1bfb5b54/RU2170025C1.pdf> (data obrashcheniya: 29.05.2020) (in Russian).
  8. Patent № 2403794 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A23C 19/16 (2006.01). Sostav dlya zashchity poverkhnosti syra ot plesneniya: № 2009100136/10; zayavl 12.01.2009; opubl 20.07.2010. Feofilova YeP, Galanina LA, Sergeyeva YAE [i dr]; zayavitel' Institut mikrobiologii im SN Vinogradskogo RAN. 6 p. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/32/fe/c1/edb904e646707f/RU2403794C2.pdf> (data obrashcheniya: 29.05.2020) (in Russian).
  9. Patent № 2580759 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A61L 2/16 (2006.01). Biotsidnoye sredstvo: № 2014153173/15; zayavl 25.12.2014; opubl 10.04.2016. Kuzikova IL, Medvedeva NG, Pervak VE; zayavitel' Federal'noye gosudarstvennoye byudzhetnoye uchrezhdeniye nauki Sankt-Peterburgskiy nauchno-issledovatel'skiy tsentr ekologicheskoy bezopasnosti Rossiyskoy akademii nauk (NITSEB RAN). 9 p. URL: [http://www.freepatent.ru/images/img\\_patents/2/2580/2580759/patent-2580759.pdf](http://www.freepatent.ru/images/img_patents/2/2580/2580759/patent-2580759.pdf) (data obrashcheniya: 29.05.2020) (in Russian).
  10. Patent № 94027109 Rossiyskaya Federatsiya. MPK D21H 21/36 (1995.01). Sposob izgotovleniya biostoykoy bumagi (varianty): № 94027109/12; zayavl 18.07.1994; opubl 10.11.1995. Dobrusina SA, Sukharevich VI, Lotsmanova YeM [i dr]; zayavitel' Nauchno-issledovatel'skiy tsentr ekologicheskoy bezopasnosti RAN. 4 p. URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU94027109A1\\_19951110](https://yandex.ru/patents/doc/RU94027109A1_19951110) (data obrashcheniya: 29.05.2020) (in Russian).
  11. Sukharevich VI, Kuzikova IL, Medvedeva NG. Zashchita ot biopovrezhdeniy, vyzyvayemykh gribami. St. Petersburg: ELBI-SPb, 2009: 207 (in Russian).
  12. Tovbis MS. Metody analiza i identifikatsii organicheskikh soyedineniy: opisaniye prakticheskikh rabot dlya aspirantov napravleniya 04.06.01 «Khimicheskiye nauki» napravlenosti «Organicheskaya khimiya», ochnoy i zaочноy form obucheniya. Krasnoyarsk: SibGU im MF Reshetneva, 2019: 35 (in Russian).
  13. Tsyganov VA, Konев YuV, Barashkova NP [i dr]. Obrazovaniye antibiotikov tipa azalomitsina F kul'turoy *Actinomyces imbricatus* n. sp. *Antibiotiki* 1970; 15(3):208–212 (in Russian).
  14. Shenin YuD, Belakhov VV, Rozhkova NG. Fungitsidnaya aktivnost' imbritsina i yego soley. *Antibiotiki i khimioterapiya* 1996; 41(6):21–24 (in Russian).

## DEVELOPMENT OF A TECHNOLOGY FOR ISOLATION OF IMBRICIN FROM CULTURAL LIQUID *STREPTOMYCES IMBRICATUS*

I.A. KRASOVITSKAYA, N.V. KOTOVA, A.V. GUSEV

*Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg*

This work is devoted to the development of technology for the isolation and purification of the non-medical antibiotic imbricin from the culture fluid of *Streptomyces imbricatus*. Imbricin is a promising antibiotic for use in agriculture, the food industry and in the fight against paper microdamages due to a wide range of fungal action, as well as a number of other positive qualities, including environmental safety.

*Keywords:* non-polyene antibiotics, imbricin, culture fluid, *Streptomyces imbricatus*, filtration, extraction, evaporation, crystallization.

### **Address:**

Krasovitskaya I.A.,  
Senior Lecturer, Department of Biotechnology  
FGBOU VO SPKhFU of the Ministry of Health of Russia.  
E-mail: Krasovizkaya.Irina@pharminnotech.com

### **Для цитирования:**

Красовицкая И.А., Котова Н.В., Гусев А.В. Разработка технологии выделения имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(3):31–36.

### **For citation:**

Krasovitskaya I.A., Kotova N.V., Gusev A.V. Development of a technology for isolation of imbricin from cultural liquid *Streptomyces imbricatus*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(3):31–36 (in Russian).

## ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ГОТОВОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ПО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

И.И. КОШКАРЕВА\*, Л.В. КАТАЕВА, Т.Ф. СТЕПАНОВА

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

Проведен микробиологический анализ готовых пищевых продуктов в нормируемом объеме. Исследовано 232 пробы продуктов, выявлено 53,9% не соответствующих санитарно-гигиеническим требованиям. В структуре бактерий группы кишечной палочки доминировали: *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и *Citrobacter* spp. Осуществлена оценка микробного пейзажа пищевых продуктов в 25 г. В исследуемых пробах обнаружены условно-патогенные бактерии, которые при определенных условиях могут значительно снижать качество пищевой продукции и становиться источником бактериальных и токсикоинфекций.

**Ключевые слова:** пищевые продукты, бактерии, нормативно-методическая документация, санитарно-гигиенические требования.

### Введение

Питание является одним из важнейших факторов, определяющих здоровье населения. Качественное сбалансированное питание способствует профилактике заболеваний, повышению работоспособности, создает условия для адекватной адаптации к окружающей среде. Ведущее место в санитарно-бактериологических исследованиях занимают продовольственное сырье и пищевые продукты [9]. Основными документами, регламентирующими процессы производства (изготовления), хранения, перевозки (транспортирования), реализации и утилизации пищевой продукции, являются технические регламенты Таможенного союза (ТР ТС). На предприятиях, согласно ТР ТС, при осуществлении процессов производства пищевой продукции изготовитель должен разработать, внедрить и поддерживать процедуры, основанные на принципе ХАССП: от англ. сокр. НАССР — Hazard Analysis and Critical Control Points (Анализ опасностей и критические контрольные точки) [1]. Система ХАССП — общепризнанная в мировом масштабе

система, предусматривающая систематическую идентификацию, оценку и управление опасными факторами, существенно влияющими на безопасность продукции.

Одним из важнейших критериев, характеризующих качество и безопасность пищевых продуктов и продовольственного сырья, служит нормирование микробиологических показателей. С целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в РФ проводится регулярный мониторинг показателей качества пищевой продукции. По данным ежегодных статистических отчетов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, за период 2013–2018 гг. произошло снижение доли проб пищевой продукции, не соответствующей гигиеническим нормативам по микробиологическим показателям: с 4,59% в 2013 году до 3,88% в 2018 году [3]. Основными группами продуктов питания неудовлетворительного качества по микробиологическим показателям отмечены следующие: мясо и мясные продукты, молоко и молочные продукты, продукция детского питания [4]. Известно, что бактерии, контаминирующие пищевые продукты и сырье, принадлежат к признанным возбудителям острых кишечных инфекций и бактериальных пищевых отравлений.

Цель исследования — оценить качество готовой пищевой продукции по микробиологическим показателям.

© 2021 г. Кошкарева И.И., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф.

\* **Автор для переписки:**

Кошкарева Ирина Игоревна

врач-бактериолог бактериологической лаборатории

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

E-mail: i.koshckareva@yandex.ru

## Материалы и методы

Для проведения микробиологического мониторинга качества и безопасности пищевой продукции были исследованы пробы из столовых, кафе, пищеблоков детских дошкольных и лечебно-профилактических организаций. Объектами микробиологического исследования послужили 133 образца готовых кулинарных изделий, 55 проб молока и молочных продуктов и 44 — кондитерских изделий. Отбор образцов проводили в соответствии с требованиями: ГОСТ 26809.1-14, ГОСТ 26809.2-14, ГОСТ 31904-12, пробоподготовка — согласно ГОСТ 26669-85. Гомогенизация пищевых продуктов с целью их дальнейшего качественного и количественного анализа осуществлялась с помощью измельчителя Stomacher. Все микробиологические показатели определяли путем посева нормируемой массы продукта или серийных разведений продукта в жидкие селективные среды с дальнейшим пересевом на дифференциальные среды и выделением чистой культуры [10]. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) определялось на микробиологическом экспресс-анализаторе БакТрак 4300, принцип действия которого основан на регистрации изменения электрического импеданса питательной среды в пробе. Посев жидкого продукта или разведений навески проводили глубинным методом на питательный агар. Вычисление количества микроорганизмов проводили по ГОСТ 26670-91, МУК 4.2.2578-2010. Исследования проб готовой кулинарной продукции и кондитерских изделий осуществляли в соответствии с нормативными документами: ГОСТ 31747-2012, ГОСТ 31746-2012, ГОСТ 10444.12-2013, ГОСТ 30726-2001, безопасность оценивалась по ТР ТС 021/2011 «Технический регламент о безопасности пищевой продукции». Пробы молока и молочной продукции изучались по ГОСТ: 10444.15-1994, 32901-2014, 31746-2012, 33566-2015; безопасность оценивалась по ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции». Бактериальные культуры идентифицировались с помощью настольного времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией MALDI-TOF Biotyper MicroFlex (Bruker, Германия). Подсчет КМАФАнМ молока и молочных продуктов проводили с помощью автоматического счетчика колоний Flash & Go (Испания).

## Результаты и обсуждение

Важно подчеркнуть, что исследуемые виды пищевой продукции перед употреблением не требуют дальнейшей термической обработки. Выявлено, что 53,9% исследованных проб в объеме, установленных

методической документацией, не отвечали санитарно-гигиеническим требованиям. Преобладающее большинство составили готовые кулинарные изделия, в кондитерских изделиях — значительно меньший удельный вес (рис. 1).

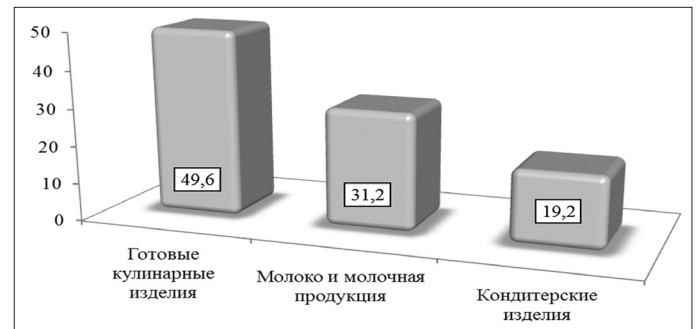


Рис. 1. Распределение не соответствующих санитарно-гигиеническим требованиям проб по видам продукции (%)

Большинство несоответствий составили образцы, содержащие бактерии группы кишечной палочки (БГКП), — более 50%, четверть проб — по КМАФАнМ, около 5% — дрожжи, плесени и *Staphylococcus aureus*. Показатель КМАФАнМ характеризует общее содержание микроорганизмов (бактерии, дрожжи, плесневые грибы), численность которых может свидетельствовать о качестве продукта и степени его обсемененности. Следовательно, контроль на всех технологических этапах позволяет оценить, как меняется качество после тепловой обработки, не претерпевает ли продукт повторного загрязнения после термообработки, во время фасовки и хранения [11]. Известно, что БГКП являются индикатором санитарно-гигиенического состояния производства и указывают на вероятное загрязнение сырья, используемого при производстве пищевой продукции [6], в то время как бактерии *S. aureus* вызывают пищевые интоксикации. В свою очередь, многие виды плесневых грибов способны вызывать заболевания с пищевым путем передачи. Рост плесеней сопровождается резким ухудшением качества продуктов (плесневением, гниением и другими видами порчи), а также может приводить к накоплению токсических метаболитов-микотоксинов, обладающих гепатотоксическим, нефротоксическим и канцерогенным действием [7]. Анализируя результаты исследований, необходимо отметить, что в нормируемом объеме среди не соответствующих требованиям проб структура выявленных БГКП в большинстве процентов случаев представлена *Enterobacter* spp. (рис. 2). Бактерии рода *Enterobacter*, в свою очередь, включены в группу колиформ как индикаторы качества пищевой продукции.

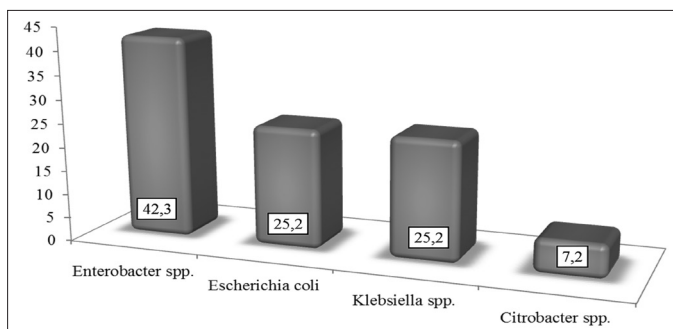


Рис. 2. Структура обнаруженных БГКП в нормируемом объеме (%)

Также были обнаружены единичные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*: *Pantoea agglomerans*, *Pantoea septica*, *Enterobacter cancerogenus*, *Leclercia adecarboxylata*, *Raoultella planticola*, которые не входят в состав показателя БГКП по ферментации лактозы на среде Гисса. По данным литературы, *L. adecarboxylata* чаще всего выделяют как часть смешанного микробного роста [15].

В исследованных пробах пищевых продуктов, соответствующих и не соответствующих требованиям, идентифицировались все выросшие микроорганизмы, как в нормируемом объеме, так и в объеме 25 г. Структура проб, соответствующих требованиям нормативной документации, но содержащая сопутствующие условно-патогенные бактерии, была представлена: *Bacillus* spp. — 33,6%, БГКП — 28,2%, *Enterobacter* spp. — 19,6%, *Enterococcus* spp. — 6,5%, неферментирующие грамотрицательные бактерии — 12,1%. Также параллельно с ростом санитарно-показательных бактерий в нормируемом объеме и не соответствующих требованиям, высевались споровые грамположительные бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* и неферментирующие грамотрицательные бактерии *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas aeruginosa*. Необходимо подчеркнуть, что порчу белоксодержащих продуктов вызывают преимущественно бактерии родов *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Proteus*, дрожжи рода *Candida* [13]. В сыром молоке наиболее часто встречаются бактерии рода *Pseudomonas*, которые продуцируют термоустойчивые липолитические и протеолитические ферменты, выдерживающие пастеризацию [8]. В свою очередь, употребление в пищу продуктов, контаминированных бактериями *Bacillus cereus*, при определенных условиях может вызывать у человека широкий спектр заболеваний, включающих в себя пищевые токсикоинфекции с преобладающим диарейным синдромом [14]. Регулирование температуры хранения пищи важно для предотвращения распространения микроорганизмов.

Подытоживая, следует указать на то, что пищевые продукты, соответствующие нормативно-методической до-

кументации, но контаминированные условно-патогенными бактериями в большем объеме от нормируемого, могут представлять опасность для детей и лиц с заболеваниями желудочно-кишечного тракта [12]. Известно, что условно-патогенные бактерии *E. coli*, бактерии родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, попадая в пищеварительный тракт взрослых людей, по-разному проявляют свою жизнеспособность: у детей через 3 часа с момента контаминации отмечается интенсивное размножение бактерий, что способствует быстрому развитию бактериальной токсикоинфекции. Помимо этого, они могут участвовать в передаче генов, кодирующих антибиотикорезистентность, что приводит к дальнейшему распространению устойчивых штаммов, в результате чего в среде обитания появляются новые возбудители с повышенной агрессивностью [6]. Биологическая опасность продуктов питания — это серьезная проблема пищевой промышленности, поскольку она тесно взаимосвязана с большинством вспышек болезней, передаваемых через пищевые продукты [5]. Следует отметить, что минимальные нарушения условий хранения и транспортировки готовой пищевой продукции способствуют его порче, что в итоге приводит к значительному снижению качества. Оценка микробиологического риска базируется на достоверной научной информации о патогенном потенциале и механизмах выживаемости семейства *Enterobacteriaceae* — наиболее значимых возбудителей пищевых токсикоинфекций. При этом надо отметить, что указанные бактерии обладают множеством факторов патогенности, среди которых ведущую роль играют адгезивная активность, факторы персистенции и продукции энтеротоксинов [2].

## Заключение

Таким образом, результаты микробиологических исследований готовой пищевой продукции показали, что более половины исследованных образцов не соответствовали санитарно-гигиеническим нормативам: больший процент этих образцов составили кулинарные изделия. Анализируя представленные данные, нужно подчеркнуть, что обеспечение населения качественной готовой пищевой продукцией является неотъемлемой частью укрепления здоровья населения. На сегодняшний день в соответствии с ФЗ № 52 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» и СП 1.1.1058-01 «Организация и проведение производственного контроля за соблюдением санитарных правил и выполнением санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» на предприятиях пищевой продукции необходимо проводить в должной мере комплекс мероприятий по соблюдению санитарных правил и гигиенических нормативов, направленных на организацию

контроля за качеством и безопасностью. Важнейшими принципами производственного контроля неизменно должны быть мониторинг и оценка рисков здоровья населения.

## Литература

1. Бородкина И.В., Шадрова Н.Б., Прунтова О.В., Ручнова О.И., Ерофеева Е.С., Данильченко С.И., Ерофеев С.Г. Характеристика микробной контаминации сырья и продукции животного происхождения в Российской Федерации за период с 2015 по 2018 год // Ветеринария сегодня. — 2020. — № 1(32). — С. 51–59. doi: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-51-59.
2. Габидуллин З.Г., Ахтариева А.А., Туйгунов М.М., Суфияров Р.С., Туйгунова В.Г., Суфияров Р.Р., Габидуллин Ю.Э., Изикаев В.М., Идиатуллина Г.А. Факторы патогенности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, обеспечивающие выживание в организме хозяина // Медицинский вестник Башкортостана. — 2009. — Т. 4(5). — С. 86–94.
3. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году» / Федерал. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. — М., 2019. — 254 с.
4. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году» / Федерал. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. — М., 2020. — 299 с.
5. Елисеева Л.Г., Махотина И.А., Калачаев С.Л. Безопасность пищевых продуктов — одна из ключевых составляющих обеспечения продовольственной безопасности // Национальная безопасность / nota bene. — 2019. — № 1. — С. 1–19. doi: 10.7256/2454-0668.2019.1.28958.
6. Ефимочкина Н.Р., Ростова Н.В., Маркова Ю.М., Короткевич Ю.В., Шевелёва С.А. Свойства энтеробактерий, выделенных из молочных продуктов // Молочная промышленность. — 2015. — № 11. — С. 33–36.
7. Ефимочкина Н.Р. Наиболее значимые виды микроорганизмов молока и молочной продукции // Молочная промышленность. — 2016. — № 10. — С. 43–50.
8. Марусич О.С., Грицкевич Е.Р. Содержание бактерий *Vacillus cereus* в рисе и рисовых продуктах в зависимости от различных видов тепловой обработки и способа хранения // Сахаровские чтения 2018 года: экологические проблемы XXI века: материалы 18-й международной научной конференции: в 3 частях. Ч. 2 / Под ред. С.А. Маскевича, С.С. Позняка. — Минск, 2018. — С. 73–75.
9. Прусова В.Н., Кива М.С., Клименко В.В. Микробиологический мониторинг за пищевыми продуктами // Здоровье. Медицинская экология. Наука. — 2015. — № 4(62). — С. 142–146.
10. Станкевич А.А., Нитяга И.М., Быкова И.Б., Ефимочкина Н.Р. Частота выделения и антибиотикорезистентность бактерий рода *Klebsiella* — контаминантов пищевых про-

- дуктов // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. — 2018 — Т. 80. — Часть II. — С. 347–350. doi: 10.30917/АТТ-PRINT-2018-4.
11. Шатрова И.И. Показатель КМАФАнМ — как критерий качества продукции // Вестник Донского государственного аграрного университета. — 2021. — № 1–1(39). — С. 15–19.
  12. Шевелева С.А., Куваева И.Б., Ефимочкина Н.Р., Минаяева Л.П. Микробиологическая безопасность пищи: развитие нормативной и методической базы // Вопросы питания. — 2020. — Т. 89(4). — С. 125–145.
  13. Эльхедми А.Э., Элькаиб Х.М., Леонтьев В.Н. Характеристика бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из пищевых продуктов // Труды БГТУ. № 4. Химия, технология органических веществ и биотехнология. Минск. — 2015. — № 4(177). — С. 251–255.
  14. Эльхедми А.Э. Защита пищевых продуктов от микробиологической порчи // Вестник Технологического университета (Казань). — 2017. — Т. 20(10). — С. 149–151.
  15. Temesgen Z., Toal D.R., Cockerill F.R. 3<sup>rd</sup>. *Leclercia adedecarboxylata* infections: Case report and review // Clin. Infect. Dis. — 1997. — Vol. 25(1). — P. 79–81. doi: 10.1086/514514.

## References

1. Borodkina IV, Shadrova NB, Pruntova OV, Ruchnova OI, Yerofeyeva YeS, Danil'chenko SI, Yerofeyev SG. Kharakteristika mikrobnoy kontaminatsii syr'ya i produktii zhivotnogo proiskhozhdeniya v Rossiyskoy Federatsii za period s 2015 po 2018 god. Veterinariya segodnya 2020; 1(32):51–59. doi: 10.29326/2304-196X-2020-1-32-51-59 (in Russian).
2. Gabidullin ZG, Akhtariyeva AA, Tuygunov MM, Sufiyarov RS, Tuygunova VG, Sufiyarov RR, Gabidullin YUZ, Izikayev VM, Idiatullina GA. Faktory patogenosti bakteriy semeystva *Enterobacteriaceae*, obespechivayushchiye vyzhivaniye v organizme khozyaina. Meditsinskiy vestnik Bashkortostana 2009; 4(5):86–94 (in Russian).
3. Gosudarstvennyy doklad «O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2018 godu». Federal. sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka. Moscow, 2019: 254 (in Russian).
4. Gosudarstvennyy doklad «O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2019 godu». Federal. sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka. Moscow, 2020: 299 (in Russian).
5. Yeliseyeva LG, Makhotina IA, Kalachayev SL. Bezopasnost' pishchevykh produktov — odna iz klyuchevykh sostavlyayushchikh obespecheniya prodovol'stvennoy bezopasnosti. Natsional'naya bezopasnost'/nota bene 2019; 1:1–19. doi: 10.7256/2454-0668.2019.1.28958. (in Russian).



6. Yefimochkina NR, Rostova NV, Markova YuM, Korotkevich YuV, Shevelova SA. Svoystva enterobakteriy, vydelennykh iz molochnykh produktov. *Molochnaya promyshlennost'* 2015; 11:33–36 (in Russian).
7. Yefimochkina NR. Naiboleye znachimyye vidy mikroorganizmov moloka i molochnoy produktsii. *Molochnaya promyshlennost'* 2016; 10:43–50 (in Russian).
8. Marusich OS, Gritskovich YeR. Soderzhaniye bakteriy *Bacillus cereus* v rise i risovykh produktakh v zavisimosti ot razlichnykh vidov teplovooy obrabotki i sposoba khraneniya. *Sakharovskiye chteniya 2018 goda: ekologicheskiye problemy XXI veka: materialy 18-y mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii: v 3 chastyakh. CH. 2. Pod red SA Maskevicha, SS Poznyaka. Minsk, 2018: 73–75 (in Russian).*
9. Prusova VN, Kiva MS, Klimenko VV. Mikrobiologicheskiy monitoring za pishchevymi produktami. *Zdorov'ye. Meditsinskaya ekologiya. Nauka* 2015; 4(62):142–146 (in Russian).
10. Stankevich AA, Nityaga IM, Bykova IB, Yefimochkina NR. Chastota vydeleniya i antibiotikorezistentnost' bakteriy roda *Klebsiella* — kontaminantov pishchevykh produktov. *Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im YaR Kovalenko* 2018; 80(Chast' II):347–350. doi: 10.30917/ATT-PRINT-2018-4 (in Russian).
11. Shatrova II. Pokazatel' KMAFAnM — kak kriteriy kachestva produktsii. *Vestnik Donskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 2021; 1–1(39):15–19 (in Russian).
12. Sheveleva SA, Kuvayeva IB, Yefimochkina NR, Minayeva LP. Mikrobiologicheskaya bezopasnost' pishchi: razvitiye normativnoy i metodicheskoy bazy. *Voprosy pitaniya* 2020; 89(4):125–145 (in Russian).
13. El'khedmi AE, El'kaib KhM, Leont'yev VN. Kharakteristika bakteriy roda *Pseudomonas*, vydelennykh iz pishchevykh produktov. *Trudy BGTU. Khimiya, tekhnologiya organicheskikh veshchestv i biotekhnologiya. Minsk* 2015; 4(177):251–255 (in Russian).
14. El'khedmi AE. Zashchita pishchevykh produktov ot mikrobiologicheskoy porchi. *Vestnik Tekhnologicheskogo universiteta (Kazan')* 2017; 20(10):149–151 (in Russian).
15. Temesgen Z, Toal DR, Cockerill FR 3<sup>rd</sup>. Leclercia adecarboxylata infections: Case report and review. *Clin Infect Dis* 1997; 25(1):79–81. doi: 10.1086/514514.

## EVALUATION OF THE QUALITY OF FINISHED FOOD PRODUCTS BY MICROBIOLOGICAL INDICATORS

I.I. KOSHKAREVA, L.V. KATAEVA, T.F. STEPANOVA

*Tyumen Research Institute of regional infectious pathology of the Rospotrebnadzor, Tyumen, Russia*

A microbiological analysis of finished food products in a standardized volume was carried out. 232 product samples were examined, 53.9% were found that did not meet sanitary and hygienic requirements. In the structure of bacteria, the *E. coli* group was dominated by: *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Citrobacter* spp. The assessment of the microbial landscape of food products in 25 g was carried out. In the studied samples, conditionally pathogenic bacteria were found, which, under certain conditions, can significantly reduce the quality of food products and become a source of bacterial and toxic infections.

**Keywords:** food products, bacteria, regulatory and methodological documentation, sanitary and hygienic requirements.

### **Address:**

Koshkareva I.I.  
bacteriologist at bacteriological laboratory  
Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology of  
the Rospotrebnadzor, Tyumen, Russia  
E-mail: i.koshckareva@yandex.ru

### **Для цитирования:**

Кошкарёва И.И., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф. Оценка качества готовой пищевой продукции по микробиологическим показателям. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2021; 17(2):37–41.

### **For citation:**

Koshkareva I.I., Kataeva L.V., Stepanova T.F. Evaluation of the quality of finished food products by microbiological indicators. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(2): 37–41 (in Russian).

## ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ С ЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ

Э.А. СВЕТОЧ, В.И. СУРОВЦЕВ, В.М. БОРЗЕНКОВ\*

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,  
Оболенск, Московская обл.

На основании анализа литературы и собственных данных предложена гипотеза механизма взаимодействия бактериоцинов с чувствительными бактериальными клетками. У белковых бактериоцинов (бактериолитических ферментов) этот механизм включает в себя три стадии: связывание с образованием комплекса Михаэлиса, каталитический акт, выход фермента из зоны реакции. У неферментных белков и пептидных бактериоцинов он состоит из двух стадий: связывания и эффекторной реакции. Решающее значение в обоих случаях играет связывание, обусловленное гидрофобностью и комплементарностью. При сильном связывании и тот, и другой процесс заканчивается гибелью чувствительной клетки.

*Ключевые слова:* пептидный бактериоцин, белковый ферментный бактериоцин, белковый неферментный бактериоцин, константа связывания, гидрофобность, комплементарность, эффекторная реакция.

Широкое использование антибиотиков в медицинской и ветеринарной практике, а также других отраслях хозяйственной деятельности привело к появлению болезнетворных бактерий с лекарственной резистентностью. Поэтому поиск и изучение механизма действия новых высокоактивных антимикробных веществ, эффективных против полирезистентных бактерий, представляют собой актуальную задачу. Такими веществами являются бактериоцины — обширная группа белковых веществ (ферментов, неферментных белков, пептидов), альтернативных традиционным антибиотикам и секретируемых многими видами бактерий [5, 10]. Пептидные бактериоцины, в отличие от традиционных пептидных антибиотиков, являются продуктами рибосомального синтеза (и, конечно, ферменты и неферментные белки).

В чем же преимущество бактериоцинов по сравнению с традиционными антибиотиками, почему этой группе веществ уделяется столько внимания? По некоторым данным, бактериоцины нереактогенны и нетоксичны по сравнению с традиционными антибиотиками, а их эффективное действие на чувствительные клетки в сотни раз выше, чем у традиционных антибиотиков (данные авторов [3, 12]).

Единой классификации бактериоцинов пока не существует. Согласно одной, принимаемой многими

исследователями, бактериоцины разделяют на три класса [8]:

1. Пептидные бактериоцины с молекулярной массой 3–5 кДа, содержащие лантионин и несколько других необычных аминокислот.

2. Пептидные бактериоцины с молекулярной массой 5–9 кДа, не содержащие необычных аминокислот.

3. Неферментные белки и ферменты, из которых наиболее известны энтеролизин, лизоцим и лизоцим. Лизоцим синтезируется не только клетками бактерий, но и клетками животных и человека.

Предлагаемая гипотеза взаимодействия бактериоцинов с чувствительными клетками должна ответить на ряд вопросов:

1. Как и почему бактериоцины взаимодействуют с чувствительными клетками?

2. Почему некоторые бактериоцины действуют на клетки бактерий только одного или нескольких близкородственных видов, тогда как другие — взаимодействуют с клетками широкого ряда видов, причем среди них могут быть как грамположительные, так и грамотрицательные?

3. Почему бактериоцины убивают чувствительные клетки бактерий гораздо эффективнее, чем традиционные антибиотики?

4. Как и почему происходит гибель чувствительных клеток под действием бактериоцинов?

Белковые бактериоцины (энтеролизин, лизоцим, лизоцим) являются бактериолитическими ферментами. Механизм их действия и эффективность вполне

© 2021 г. Светоч Э.А., Суровцев В.И., Борзенков В.М.

\* Автор для переписки:

Борзенков Валерий Михайлович

канд. биол. наук, ст. научный сотрудник Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

E-mail: vmborzenkov@mail.ru

ясны. Решающую роль во взаимодействии ферментных бактериоцинов с рецепторными белками на поверхности чувствительных клеток играет специфическое связывание фермента с субстратом («Лучшее связывание — лучший катализ!»). Далее происходит каталитический акт и выход фермента (белкового бактериоцина) из зоны реакции. Затем цикл повторяется.

Пептидные бактериоцины действуют в мембранном бислое чувствительных клеток. Так как подавляющее число бактериоцинов является катионными пептидами, то связывание может происходить по месту наибольшего отрицательного ионного заряда чувствительной клетки. Такими местами являются фосфатные «головы» липидов. Но это взаимодействие обратимо из-за высокой диэлектрической постоянной воды. Следовательно, практически необратимое связывание может быть лишь с другими компонентами мембран — белками. Поскольку это межмолекулярное взаимодействие не только сильное, но и специфичное, то на бактериоцине должен существовать участок («активный центр»), обеспечивающий связывание с рецептором бактериальной клетки. На белке-рецепторе чувствительной клетки тоже должен существовать соответственно специфический, связывающийся с «активным центром» бактериоцина, участок. Само связывание в случае пептидного и неферментного бактериоцинов с рецептором, как и в случае взаимодействия фермента с субстратом, должно быть комплементарным. Связывание является преимущественно гидрофобным, поскольку ионные связи слабы, комплексы с переносом заряда у белков также слабы и не дают сильной дополнительной полосы поглощения, как классические комплексы [2]. Водородные связи не могут быть определяющими из-за конкуренции водородных связей воды. Таким образом, специфическое связывание имеет определяющее значение, как для белковых, так и пептидных бактериоцинов.

На важную роль гидрофобности при связывании бактериоцина указывают данные работы Finland G. et al. (2002) [7]. В этой работе был использован пептидный бактериоцин, имеющий в своем составе три остатка триптофана (обычно — не более одного). Три-33 оказался существенным для проявления активности этого бактериоцина. При замене его гидрофобными остатками лейцина или фенилаланина активность почти не изменялась. При замене же более гидрофильным тирозином она уменьшалась в 10–20 раз, а при замене остатком аргинина — в 500–1000 раз. Замена три-18 и три-41 любой, гидрофильной или гидрофобной аминокислотой приводила к практически полной потере активности. Ав-

торы называют эти остатки триптофана «уникальными». Вероятно, они входят в состав «активного центра» бактериоцина, и их замена ведет к потере комплементарности и как результат — к потере активности.

Биологически активные пептидные бактериоцины первого класса, имеющие молекулярную массу 3–5 кДа и необычные аминокислоты в своем составе, также являются продуктами рибосомального синтеза, но не могут, как и высокомолекулярные белковые бактериоцины, синтезироваться на рибосомах и образуются посттрансляционно. По-видимому, это не случайно. «Активный центр» гораздо легче сформировать пептиду с большей, вплоть до 9 кДа, молекулярной массой; поэтому бактериоцины второго класса не имеют в своем составе необычных аминокислот, и они гораздо многочисленнее, чем бактериоцины первого класса. У бактериоцинов первого класса число обычных аминокислотных остатков весьма ограничено, и для прочного и специфичного связывания с белком-рецептором чувствительных клеток у них, как мы полагаем, и появились необычные аминокислоты. Таким образом, специфическое связывание имеет определяющее значение, как для белковых, так и для пептидных бактериоцинов.

Поскольку стехиометрически при сильном связывании один «активный центр» бактериоцина приходится на один участок связывания белка-рецептора мембранного бислоя чувствительной клетки, то для гибели всей популяции клеток достаточно наномолярных концентраций бактериоцина. Поэтому пептидные бактериоцины и белковые неферментные гораздо эффективнее традиционных антибиотиков [1].

Аминокислотные замены в участке связывания белка-рецептора бактериальной клетки с «активным центром» бактериоцина могут приводить к уменьшению чувствительности (константы связывания) и даже к полной ее потере. Если специфический участок связывания существует у мембранного белка-рецептора клеток только одного вида, то он «уникален». Соответствующий бактериоцин будет действовать на клетки только этого вида. Если такой же или близкий к нему по первичной структуре участок связывания имеется у клеток другого вида (или видов), то все они будут взаимодействовать с этим бактериоцином, причем среди них могут быть и грамположительные [4], и грамотрицательные [6]. Так, в исследовании [1] был использован рекомбинантный бактериоцин («авидин»), природным продуцентом которого является *Enterococcus avium*. Авидин сильно связывается с клетками *Listeria monocytogenes*, а также (слабее) — с *Streptococcus faecalis*. Но оказалось, что авидин взаимодействует и с клетками

*Escherichia coli* ATCC 25932, так же, как и с клетками *S. faecalis*. С клетками *E. coli* С600 этот бактериоцин связывался слабо, а с клетками трех других штаммов *E. coli* практически не взаимодействовал.

Согласно предлагаемой нами гипотезе, у клеток *E. coli* ATCC 25932 участок связывания белка-рецептора такой же (или близкий), как у клеток *S. faecalis*, а у других штаммов *E. coli*, по мере увеличения количества замен в аминокислотной последовательности белка-рецептора, связывание слабеет и затем практически исчезает.

Гибель чувствительных клеток бактерий происходит различным образом в зависимости от белка-рецептора, с которым связывается бактериоцин. Например, в результате связывания может изменяться конформация белка-рецептора с образованием пор, которые сохраняются при латеральном движении компонентов мембранного бислоя. После образования пор проницаемость мембраны нарушается, что приводит к гибели клетки. Гибель клетки происходит так же, если белком-рецептором является белок в мембранном бислое, выполняющий важную для жизнедеятельности клетки функцию, например, регуляторную, транспортную [9] или ферментативную [11]. Известно, что при взаимодействии авицина с клеткой *L. monocytogenes* таким белком являлась маннозо-трансфераза. Для гибели популяции этих чувствительных клеток достаточно было использовать авицин в концентрации 3,3 нМ [1].

Итак, при взаимодействии белковых и пептидных бактериоцинов с микробной клеткой-мишенью решающую роль играет сильное специфическое связывание, обеспечиваемое комплементарностью и имеющее преимущественно гидрофобный характер. После связывания у ферментных бактериоцинов происходит каталитический акт, а после связывания пептидных и белковых неферментных бактериоцинов — эффекторная реакция. В обоих случаях процесс заканчивается гибелью чувствительной клетки.

## Литература

1. Баландин С.В., Финкина Е.И., Нурмухамедова Э.К., Тагаев А.А., Умнякова Е.С., Кокряков В.Н., Швец В.И., Овчинникова Т.В. Биотехнологический способ получения и характеристика рекомбинантного антимикробного пептида авицина из *Enterococcus avium* // Доклады Академии наук. — 2019. — Т. 484. — № 4. — С. 491–494.
2. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. — М.: «Изд-во Мир», 1972. — 304 с.
3. Borzenkov V., Surovtsev V., Dyatlov I. Obtaining bacteriocins by chromatographic methods // Advances in Bioscience and Biotechnology. — 2014. — Vol. 5. — No. 5. — P. 446–451.

4. Cintas L.M., Casaus P., Havarstein L.S., Hernandez P.E., Nes J.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum // Applied Environ. Microbiol. — 1997. — Vol. 63. — Issue 11. — P. 4321–4330.
5. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? // Nat. Rev. Microbiol. — 2013. — Vol. 11. — P. 95–105.
6. De Kwaadsteniet M., Todorov S. D., Knoetze H., Dicks L.M.T. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria // International Journal of Food Microbiology. — 2005. — Vol. 105. — Issue 3. — P. 433–444.
7. Fimland G., Eijsink V.G., Nissen-Meyer J. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide // Biochemistry. — 2002. — Vol. 41. — No. 30. — P. 9508–9515.
8. Karpinski T.M., Szkaradkiewicz A.K., Caballero B. et al. Bacteriocins / In: Encyclopedia of Food and Health. — Amsterdam: Elsevier Science, 2016. — P. 312–319.
9. Kjos M., Nes J.F., Diep D.B. Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells // Microbiology. — 2009. — Vol. 155. — Issue 9. — P. 2949–2961.
10. Mokoena M.P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens // Molecules. — 2017. — Vol. 22. — No. 8. — P. 1255–1262.
11. Parks W.M., Bottrill A.R., Pierrat O.A., Durrant M.C., Maxwell A. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase // Biochimie. — 2007. — Vol. 89. — Issue 4. — P. 500–507.
12. Surovtsev V.I., Borzenkov V.M., Levchuk V.P. Purification of bacteriocins by chromatographic methods // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2015. — Vol. 51. — No. 9. — P. 881–886.

## References

1. Balandin SV, Finkina YeI, Nurmukhamedova EK, Tagayev AA, Umnyakova YeS, Kokryakov VN, Shvets VI, Ovchinnikova TV. Biotekhnologicheskii sposob polucheniya i kharakteristika rekombinantnogo antimikrobnogo peptida avitsina iz *Enterococcus avium*. Doklady Akademii nauk 2019; 484(4):491–494 (in Russian).
2. Dzhensk V. Kataliz v khimii i enzimologii. Moscow: «Izd-vo Mir», 1972: 304 (in Russian).
3. Borzenkov V, Surovtsev V, Dyatlov I. Obtaining bacteriocins by chromatographic methods. Advances in Bioscience and Biotechnology 2014; 5(5):446–451.
4. Cintas LM, Casaus P, Havarstein LS, Hernandez PE, Nes JF. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Applied Environ. Microbiol 1997; 63(11):4321–4330.

5. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 2013; 11:95–105.
6. De Kwaadsteniet M, Todorov S D, Knoetze H, Dicks LMT. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 2005; 105(3):433–444.
7. Fimland G, Eijsink VG, Nissen-Meyer J. Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry* 2002; 41(30):9508–9515.
8. Karpinski TM, Szkaradkiewicz AK, Caballero B et al. Bacteriocins. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Amsterdam: Elsevier Science, 2016: 312–319.
9. Kjos M, Nes JF, Diep DB. Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiology* 2009; 155(9):2949–2961.
10. Mokoena M.P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens. *Molecules* 2017; 22(8):1255–1262.
11. Parks WM, Bottrill AR, Pierrat OA, Durrant MC, Maxwell A. The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie* 2007; 89(4):500–507.
12. Surovtsev VI, Borzenkov VM, Levchuk VP. Purification of bacteriocins by chromatographic methods. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2015; 51(9):881–886.

## POSSIBLE MECHANISM OF INTERACTION OF BACTERIOCINS WITH SENSITIVE BACTERIAL CELLS

E.A. SVETOCH, V.I. SUROVTSEV, V.M. BORZENKOV

*The State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region*

Based on the analysis of the literature and our own data, a hypothesis of the mechanism of interaction of bacteriocins with sensitive bacterial cells is proposed. In protein bacteriocins (bacteriolytic enzymes), this mechanism includes three stages: binding with the formation of the Michaelis complex, a catalytic act, and the release of the enzyme from the reaction zone. In non-enzymatic proteins and peptide bacteriocins, it consists of two stages: binding and an effector reaction. Binding due to hydrophobicity and complementarity is critical in both cases. With strong binding, both the one and the other process ends with the death of the sensitive cell.

*Keywords:* peptide bacteriocin, protein enzyme bacteriocin, protein non-enzyme bacteriocin, binding constant, hydrophobicity, complementarity, effector reaction.

### **Address:**

Borzenkov V.M., Ph.D.  
Senior Researcher, State Scientific Center for Applied Microbiology  
and Biotechnology, Obolensk, Moscow region  
E-mail: vmborzenkov@mail.ru

### **Для цитирования:**

Светоч Э.А., Суровцев В.И., Борзенков В.М. Возможный механизм взаимодействия бактериоцинов с чувствительными клетками бактерий. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2021; 17(3):42–45.

### **For citation:**

Svetoch E.A., Surovtsev V.I., Borzenkov V.M. Possible mechanism of interaction of bacteriocins with sensitive bacterial cells. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(3): 42–45 (in Russian).

## ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЯЧЕЙКИ НА ОСНОВЕ ФОТОСИСТЕМЫ II ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ВОДОРОДА

И.А. ДОРОНИН<sup>1\*</sup>, Т.Н. ГАЕВА<sup>1</sup>, С.И. АЛЛАХВЕРДИЕВ<sup>2</sup>, Р.Г. ВАСИЛОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

<sup>2</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Фотосистема II (ФСII) эффективно расщепляет воду за счет энергии света. В обзоре рассмотрены подходы к конструированию фотоэлектрических ячеек на основе ФСII для продукции водорода. Рассматриваются различные подходы к иммобилизации ФСII как в гелях, так и на твердых подложках. Освещены искусственные и белковые катализаторы для продукции водорода на катоде. Особое внимание уделено подбору медиаторов, обеспечивающих эффективное сопряжение процессов на аноде и катоде, приведены различные варианты Z-схемы. Помимо схем с электрохимическим сопряжением фотореакции также представляют интерес системы с прямым переносом электронов по молекулярным проводам. В статье также рассмотрены основные ограничения для гибридного фотосинтеза и возможные подходы к их разрешению.

**Ключевые слова:** фотосистема II, биоводород, фотоэлектрические ячейки, Z-схема, гибридный фотосинтез, MOF.

### Введение

Солнечная энергетика за последние десятилетия сделала большой скачок вперед. В лабораторных условиях удалось достичь уровня конверсии солнечной энергии на уровне 46% для мультикаскадных элементов на основе элементов III и V групп, которые, впрочем, являются слишком дорогими по сравнению с кремниевыми элементами. Также перспективными являются элементы, сенсibilизированные красителями, эффективность которых растет [51]. Существенным недостатком солнечных панелей является необходимость использования дорогостоящих аккумуляторов и резервных источников питания. Использование топливных элементов позволяет совместить в себе преимущества высокой энергетической емкости жидкого и газового топлива с высоким КПД и экологичностью аккумуляторов.

Одними из наиболее разработанных топливных элементов являются водородные топливные ячейки. При этом 96% получаемого водорода производится из невозобновляемых природных ресурсов [50], что ставит вопрос о степени его экологичности. Производство водорода из биомассы не отличается высокой эффективностью. Одним из подходов к получению экологичного водо-

рода является его продукция электролизом воды за счет энергии солнечного света. Фотоэлектролиз состоит из нескольких процессов: захват фотонов для окисления воды (LH — light harvest), окисление молекулы воды с образованием кислорода (OER — oxygen evolution reaction), образование молекулы водорода (HER — hydrogen evolution reaction). В кислород-продуцирующих организмах, таких как цианобактерии, водоросли и растения, присутствует фотосистема II (ФСII), которая обеспечивает эффективное окисление двух молекул воды за счет четырех фотонов. Для образования молекулярного водорода из протонов и электрона также нужна энергия, которая может быть обеспечена фотонами или внешним напряжением. Наиболее распространенным подходом является пространственное разделение расщепления воды и образования водорода. Это может быть сделано за счет использования протон-проводящих мембран. Помимо ФСII, в роли фотоокислителя воды могут быть использованы соединения на основе ванадата висмута, диоксида титана и других [47].

Для эффективной фотопродукции водорода при комнатной температуре необходимо сопряжение нескольких процессов: генерация электрон-дырочной пары за счет энергии фотона, отщепление электрона и протона от молекулы воды на каталитическом центре, образование O-O связи, образование молекулярного водорода (рис. 1). При этом фотосистема II эффективно сопрягает генерацию электрон-дырочных пар в реакционном центре с процессами водоокисления на марганцевом кластере и

© 2021 г. Доронин И.А., Гаева Т.Н., Аллахвердиев С.И., Василлов Р.Г.

\* Автор для переписки:

Доронин Иван Андреевич

аспирант отдела биотехнологий и биоэнергетики НИЦ «Курчатовский институт»

E-mail: iadoronin@yandex.ru

окислением пластохинона в сайте  $Q_B$ . Уровень конверсии поглощенной энергии на начальном этапе фотосинтеза достигает 50% [6]. Соответственно для продукции водорода нужно добиться эффективного переноса электрона с пластохинона и протонов с марганцевого кластера на катализатор (платина, гидрогеназа), на котором будет происходить продукция водорода. Серьезным недостатком такого подхода является малое время жизни ФСII

при активном освещении. Несмотря на это, ячейки на основе изолированных ФСII служат хорошим стендом для проектирования твердотельных систем. Помимо ячеек на основе ФСII, также проектируют и исследуют биогрибридные ячейки с целыми клетками, тилакоидами, мембранными фрагментами цианобактерий, водорослей и растений, а также реакционными центрами фотосинтезирующих бактерий (см. обзор [28]).

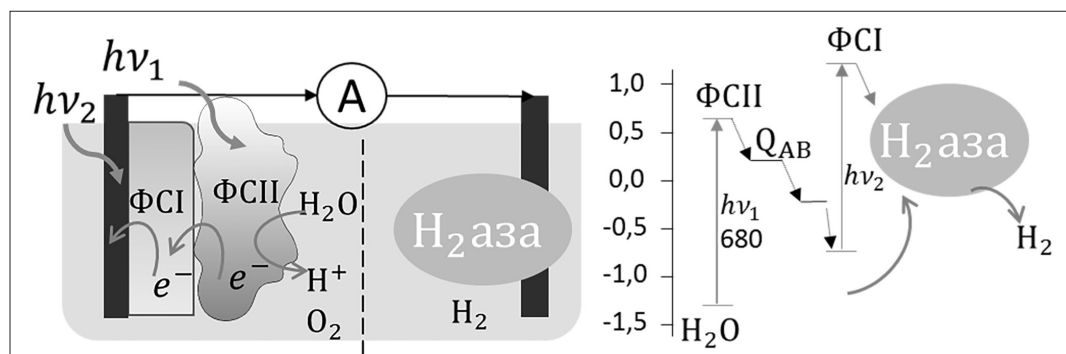
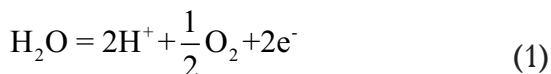


Рис. 1. Слева: общая схема гибридной ячейки для фотоэлектрохимической продукции водорода, справа: Z-схема переноса электронов, E[V] vs NHE. Пространство между фотоанодом и катодом разделено протон-проводящей мембраной. В качестве ФС I используют различные полупроводники с шириной запрещенной зоны больше 0,9 В. В качестве  $H_2$  азы могут использоваться как иммобилизованные гидрогеназы, так и искусственные катализаторы

Количество энергии, запасенной в водороде, можно оценить по удельной теплоте сгорания: при сгорании 1 моля водорода выделяется 248,1 кДж, что соответствует энергии 2,6 эВ на одну молекулу водорода. Процесс расщепления воды можно разложить на две полуреакции:



Первая реакция протекает на фотосистеме II в четыре этапа: на 1 молекулу кислорода приходится 4 фотона с энергией 1,8 эВ или 3,6 эВ на одну молекулу воды ( $\Delta G - 2,2$  эВ, эффективность ФСII  $\approx 60\%$  без учета энергии электронов, запасенной в бензохиноновых переносчиках). Во второй реакции энергия Гиббса составляет 0,45 эВ (в нейтральной среде при концентрации водорода 0,5 ppm). Для получения плотностей тока в 1 мА/см<sup>2</sup> напряжение на катоде должно составлять около -0,5 В vs NHE при использовании [NiFeSe] гидрогеназы [27], в то время как редокс-потенциал пластохинона в мембране составляет 0,01 В vs NHE [6], а при использовании водорастворимого медиатора потенциал будет составлять 0,35 В vs NHE (для 2,6-дихлор-бензохинона (DCBQ), который наиболее часто используется

в гибридных системах). Таким образом, для переноса электронов с медиатора на протон с выделением водорода необходима разность потенциалов порядка 0,85 В.

Кроме потерь внутри фотосистемы, также необходимо учитывать, что спектр поглощения ФСII представлен двумя узкими полосами 430 нм и 678 нм (пики хлорофилла). В живых клетках спектр ФС расширяется за счет антенных комплексов. Использование ФС с внешними антенными комплексами может увеличить уровень захваченной энергии. На данный момент существуют способы выделения ФСII комплексов вместе с антенными комплексами [35]; кроме того, возможно использование так называемых ВВУ: мембранных фрагментов ФСII, выделение которых менее трудоемко. При использовании слабо концентрированных растворов ФСII без антенных комплексов доля захвата захваченных фотонов составляет примерно 30%, что ограничивает общий уровень конверсии энергии 15% (LCC — light to chemical conversion).

## Фотосистема II

ФСII — несравнимо более сложная структура по сравнению со своими полупроводниковыми аналогами. ФСII состоит из следующих функциональных частей: собственного антенного комплекса (CP 43 и CP 47), реак-

ционного центра (D1, D2 белки и специальные пигменты), водоокислительного кластера, цитохрома C550 и других белков, выполняющих структурную и защитные функции. Структура ФСII обеспечивает несколько функций: эффективную передачу возбуждения на реакционный центр, расщепление воды, продукцию кислорода, пространственное разделение протона и электрона, устранение обратного тока электронов [9]. Структура ФСII была получена методами криоэлектронной микроскопии [12] и рентгеновской дифракции с разрешением до 1,9 Å [42].

На данный момент хорошо описаны процессы переноса энергии в ФСII (рис. 2). Возбужденный электрон переходит с P680 на феофетин, затем на первичный пластохинон Q<sub>A</sub>, а с него на Q<sub>B</sub> через негемовое железо. После отщепления электрона P680<sup>+</sup> становится окислительным кофактором с редокс-потенциалом более 1 В vs NHE. Данный радикал восстанавливается за счет электронов марганцевого кластера.

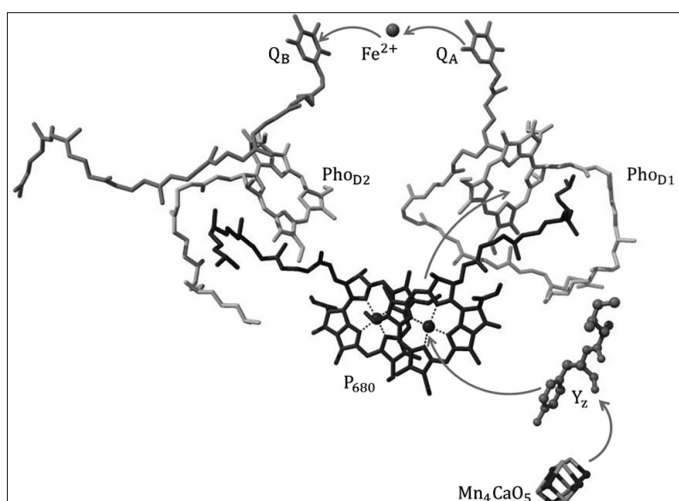


Рис. 2. Схема переноса электронов от марганцевого кластера к сайту связывания Q<sub>B</sub>. Изображение получено с помощью ChimeraX из структуры ФСII *Thermosynechococcus vulcanus*, PDB 3WU2

В качестве доноров электронов для ФСII выступают две молекулы воды, от которых на марганцевом кластере последовательно отщепляются четыре протона. Марганцевый кластер Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> располагается в люменальной части ФСII. Разрешение в 1,9 Å позволило определить строение марганцевого кластера [42], который имеет асимметричную структуру «перекошенного стула», а также указать связанные с комплексом лиганды.

Водоокисляющий кластер работает по циклу, состоящему из пяти состояний S<sub>i</sub> (цикл Кока [15, 19]), при этом кислород выделяется при переходе из S<sub>4</sub> в S<sub>0</sub>. Механизмы работы марганцевого кластера пока однозначно не опре-

делены. На текущий момент выдвигаются две концепции. Согласно внешней концепции, атомы марганцевого кластера не покидают его, а образование молекулярного кислорода происходит из атомов кислорода, связанных с Mn<sub>4</sub> и Ca. Согласно внутренней концепции, в образовании O<sub>2</sub> участвует атом кислорода, связанный в S<sub>0</sub> состоянии с атомами Mn<sub>4</sub> и Mn<sub>3</sub>. Исследователи ищут альтернативу ФСII, недостатком которой является низкая стабильность (в живых клетках постоянно идет репарация D1 субъединицы ФСII).

За последние десятилетия были созданы разные катализаторы для эффективного окисления воды [53]. Гетерогенные катализаторы на данный момент наиболее эффективны для практических приложений. С другой стороны, гомогенные катализаторы привлекают возможностями модификации и исследования механизмов. Кроме того, представляют интерес молекулярные катализаторы, иммобилизованные на поверхности или включенные в состав металлоорганических каркасных структур (MOF), что повышает их стабильность и возможность восстановления. После обнаружения каталитических свойств у [bpy<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O-RuORuH<sub>2</sub>Oby<sub>2</sub>]<sup>4+</sup> [11] было найдено большое количество рутениевых OER катализаторов, особенно за последнее десятилетие. Новые катализаторы на основе Ru демонстрируют активность, сравнимую с марганцевым кластером ФСII [7]. В работе [30] удалось связать катализаторы на основе Ru с CdS, что потенциально позволит создать искусственный аналог ФСII. Также ведутся разработка и исследование молекулярных катализаторов на основе иридия и распространенных в земной коре элементов первой строки переходных металлов, таких как марганец, железо, медь, никель и медь.

Проектирование более эффективных молекулярных катализаторов требует понимания деталей механизма окисления воды. Для получения данных о катализаторах применяются разнообразные экспериментальные методы: масс-спектрометрия, электрохимический анализ и рентгеноструктурные методы. Данные методы дают ценную информацию о структуре, редокс-потенциале и степени окисления металлов, участвующих в образовании O-O связи. Однако затруднительно получить целостную картину о каталитическом цикле из экспериментов, особенно сложно получить данные о структуре и энергетике промежуточных соединений. Квантовые вычисления позволяют преодолеть некоторые ограничения для дополнения экспериментальной работы [22].

Значительные усилия направлены на создание моно- и мультядерных марганцевых комплексов, способствующих продукции кислорода. В 2014 году был синтезирован и описан моноядерный марганцевый комплекс [Mn(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>{Py<sub>2</sub>N(tBu)<sub>2</sub>}]<sup>2+</sup> (Py=pyridyl), спо-



собный к электрохимическому катализу при потенциале 1,3 В в водном растворе при рН=12 [20]. Несмотря на значительный прогресс в дизайне OER катализаторов, ФСП на данный момент является наиболее совершенной системой для фотоокисления воды. Эффективный перенос электронов от ФСП к HER катализаторам зависит от используемого электронного переносчика.

В тилакоидных мембранах акцептором электронов является пластохинон. Пластохинон имеет три стабильных конфигурации: Q, Q<sup>-</sup> и QH<sub>2</sub>. При этом хинон в состоянии Q<sup>-</sup> прочно связывается с сайтом связывания Q<sub>B</sub>, а другие формы свободно его покидают. После протонирования атомов кислорода дипольный момент ОН группы становится направленным против моментов лигандов /D His 214 и Phe 261, что, возможно, приводит к выталкиванию пластохинона из сайта и замене на новый из мембранного пула.

При использовании искусственных переносчиков механизм переноса заряда может меняться. При этом DCBQ частично протонируется только по одному концу ( $pK_a(\text{HQ}^-)=7,24$ ,  $pK_a(\text{H}_2\text{Q})=3,34$ ,  $pK_a(\text{HQ})=0,49$ ). Кроме того, DCBQ может отрывать электроны вне сайта связывания Q<sub>B</sub>. Альтернативой DCBQ могут являться 2,6-диметилбензохинон (DMBQ) и 2,3,6-триметилбензохинон (TMBQ). DMBQ использовался в работе [21] в паре с феррицианидом калия (FeCy), который часто используется в качестве конечного акцептора электронов при измерении активности ФСП. DMBQ имеет более низкий редокс-потенциал по сравнению с DCBQ (0,24 В и 0,35 В vs NHE соответственно). С другой стороны, DCBQ, в отличие от DMBQ и TMBQ, остается в окисленном состоянии заряженной молекулой, что может увеличивать скорость диффузии (табл. 1).

Таблица 1

**Редокс-потенциалы, В vs NHE и константы диссоциации бензохинонов [14]**

Соединение	[Q/Q <sup>-</sup> ]	[Q <sup>-</sup> /Q <sup>2-</sup> ]	[HQ/HQ <sup>-</sup> ]	[Q, H <sup>+</sup> /HQ <sup>-</sup> ]	[Q, 2H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> Q]	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$pK_{a,3}$
						[HQ <sup>-</sup> ]	[H <sub>2</sub> Q]	[HQ]
pBQ	0,10	0,02	0,45	0,40	0,69	11,40	9,85	4,10
DMBQ	-0,09	-0,10	0,24	0,26	0,55	11,81	9,98	6,05
TMBQ	-0,21	-0,19	0,16	0,16	0,49	12,18	11,04	6,10
DCBQ	0,39	0,35	0,75	0,58	0,68	7,24	3,34	0,49

На данный момент не опубликовано экспериментальной работы со сравнением всех медиаторов в одних условиях. Известно, что p-бензохинон (pBQ) показывает более низкую активность по сравнению с DCBQ, что, по-видимому, вызвано слишком высокой аффинностью pBQ к сайту связывания Q<sub>B</sub> [44]. Избыточное связывание ингибирует перенос заряда и активирует альтернативные пути переноса электронов в ФСП [1]. В гибридных ячейках электроны, захваченные от ФСП, переносятся медиаторами к аноду, а затем за счет ЭДС или фото-ЭДС переносятся на катод, на котором происходит восстановление протонов до молекулярного водорода.

### HER катализ

Эффективность продукции водорода напрямую зависит от катализатора на поверхности катода. Это могут быть платина, сложные комплексы, такие как металлоорганические каскадные системы (MOF-metal organic framework) [5], наночастицы [54] или гидрогеназы [43]. Активность катализатора зависит от температуры, рН, эффективной площади поверхности (или количества

сайтов связывания в случае MOF и гидрогеназ). Кроме того, дизайн пор в MOF и гидрогеназах также влияет на диффузию, что существенно влияет на реальную активность.

В настоящей обзорной статье будут рассмотрены наиболее эффективные катализаторы из каждого класса соединений. При этом необходимо учитывать, что корректное сравнение может быть выполнено только при одинаковых условиях (рН, температура, состав среды); поэтому экстраполяция характеристик катализатора на другие условия может оказаться не вполне корректной. Среди характеристик HER используют коэффициент Тафеля, число оборотов (TOF, количество молей продукта на моль катализатора в секунду), перенапряжение при фиксированном токе в 10 мА см<sup>-2</sup> ( $\eta@10 \text{ мА см}^{-2}$ ).

Равновесный потенциал на катоде зависит от активности ионов гидроксония  $a_{\text{H}^+}$ , концентрации молекулярного водорода  $[\text{H}_2]$  и температуры T, согласно уравнению Нернста:

$$E'_0 = E_0 + \frac{RT}{2F} + \ln\left(\frac{a_{\text{H}^+}}{[\text{H}_2]}\right),$$

где  $E_0$  — стандартный водородный потенциал.

Электрокаталитические реакции, описываются с помощью уравнений Батлера — Фолмера:

$$j = j_0 \left( \frac{c_1(t)}{c_{10}} \exp\left(\frac{\alpha n F}{RT} \eta\right) - \frac{c_2(t)}{c_{20}} \exp\left(-\frac{(1-\alpha) n F}{RT} \eta\right) \right),$$

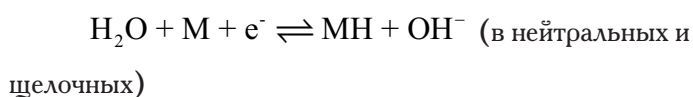
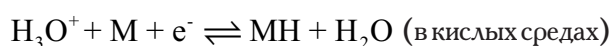
где  $\eta = E - E_0$  перенапряжение,  $\alpha$  — коэффициент переноса,  $c_1$  и  $c_2$  — концентрации субстрата и продукта реакции соответственно. При малых обратных токах токи описываются уравнением Тафеля

$$b \lg\left(\frac{j}{j_0}\right) = \eta,$$

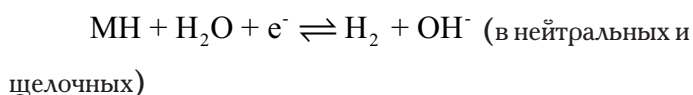
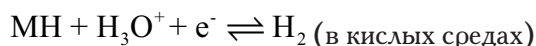
где  $b$  — константа Тафеля, которая может быть выражена как  $\frac{2,3RT}{\alpha n F}$ . Для HER/HOR реакций эф-

фективная константа Тафеля зависит от типа катализатора и от режима протекания реакции [36]. Так, константа Тафеля зависит от доли занятых сайтов связывания  $\theta$ , которая, в свою очередь, зависит от перенапряжения. Это вызвано тем, что процесс образования (разложения) водорода проходит в два этапа: потенциал-зависимая адсорбция протонов на поверхности катализатора (реакция Фолмера), реакция образования молекулярного водорода из адсорбированных на поверхности атомов водорода (реакция Тафеля) или потенциал-зависимая десорбция (реакция Хейровского).

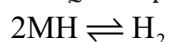
Реакция Фолмера:



Реакция Хейровского:



Реакция Тафеля:



В зависимости от наиболее медленной стадии получаются различные зависимости тока от перенапряжения [37]:

- Фолмера:  $I = nFAk_{Volmer} a_{H^+} \exp(-\alpha f \eta)$ ,

- Хейровского:

$$I = nFA \left[ \frac{k_{Heyrovsky} k_{Volmer} a_{H^+}^2 \exp(-\alpha f \eta)}{a_{H_2O} k_{Volmer}^{-1} \exp(f \eta) + k_{Volmer} a_{H^+}} \right],$$

- Тафеля:

$$I = nFAk_{Tafel} \left[ \frac{k_{Volmer} a_{H^+}^2 \exp(-\alpha f \eta)}{a_{H_2O} k_{Volmer}^{-1} \exp(f \eta) + k_{Volmer} a_{H^+}} \right]^2,$$

где  $k$  и  $k^{-1}$  — скорости прямой и обратной реакций,  $f=F/RT$ . Таким образом, при нормальных условиях и  $\alpha=0,5$  константы Тафеля равны  $\approx 30, 40$  и  $120$  мВ. Соответственно по значению константы Тафеля можно оценить, какая реакция является узким местом.

Наиболее низкая константа Тафеля регистрируется при продукции водорода ограниченной реакцией Тафеля  $\approx 30$  мВ. Такими характеристиками в кислых средах обладают платина и некоторые другие катализаторы. В случае MOF и гидрогеназы определяющими стадиями являются реакция Фолмера или Хейровского.

Уровень каталитической активности во многом определяется энтальпией связывания иона водорода с катализатором  $\Delta G_H$ . Наилучшую активность, согласно принципу Сабатье, показывают соединения, у которых значение  $\Delta G_H$  близко к нулю. Среди чистых металлов наиболее высокую каталитическую активность демонстрируют платина и палладий. При этом графитизированные наночастицы углерода, покрытые платиной (20% Pt/C), уже применяются в топливных элементах и служат эталоном для сравнения, демонстрируя высокую активность. Уменьшение размера наночастиц позволяет увеличить эффективную каталитическую площадь поверхности, однако, как было показано [40], каталитическую активность демонстрируют грани Pt, а не ребра; поэтому при уменьшении размеров меньше 2 нм активность начинает снижаться. Наночастицы рутения являются менее дорогой альтернативой платине. При этом наночастицы рутения, связанные в слоях C<sub>2</sub>N (Ru@C<sub>2</sub>N), показывают высокую активность и стабильны в широком диапазоне pH [24], что важно для использования в гибридных системах.

Вместо благородных металлов в качестве катализаторов могут использоваться соединения переходных металлов. Их активность в порядке убывания Ni>Mo>W>Fe>Cu [54]. В последние десятилетия получены катализаторы на основе переходных металлов с активностью, сравнимой с 20% Pt/C. При этом в зависимости от лигандов  $\Delta G_H$  соединения активность может становиться близкой к нулю. Так, высокую активность демонстрируют наностержни никеля, покрытые NiP<sub>2</sub>. Дополнительное покрытие наностержней рутением позволило получить активность, близкую к коммерческому 20% Pt/C [23]. Неплохую активность демонстрируют наночастицы Ni-Cu, заключенные в монослоях графена.

Рекордную активность демонстрируют наносплавы никеля, молибдена и кислорода, но при этом они отличаются крайне низкой стабильностью.

Помимо наночастиц, разработаны HER катализаторы на основе MOF (подробный обзор [5]). Среди стабильных MOF катализаторов можно выделить несколько с константой Тафеля меньше 90 мВ. 3D MOF на основе ферроцендифосфатов и 4,4'-бипиридиновых лигандов (3D Ni<sub>3</sub>bpyfcdH<sub>p</sub> и 3D CobpyfcdH<sub>p</sub>) демонстрируют неплохую стабильность и константу Тафеля на уровне 60 мВ для Ni и 65 мВ — для Co в 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [18]. Интерес также представляют соединения гексааминогексаазатринафталина (НАНАТН), в которых атомы переходных металлов связаны двумя и четырьмя N-группами. При этом максимальную активность также демонстрируют Ni-соединения Ni<sub>3</sub>(Ni<sub>3</sub>НАНАТН)<sub>2</sub> (константа Тафеля 45,6 мВ в 0,1 M KOH) [13]. Каскадная структура обладает крупными шестиугольными порами, облегчающими диффузию к каталитическим сайтам NiN<sub>2</sub>. Перенапряжение в η<sub>10</sub>=0,12 В делает Ni<sub>3</sub>(Ni<sub>3</sub>НАНАТН)<sub>2</sub> перспективным катализатором для использования в гибридных ячейках для продукции водорода. Ni также входит в состав некоторых гидрогеназ.

Гидрогеназы способны как разлагать (HOR), так и продуцировать водород. Их различают по металлам, входящим в реакционный центр: [Fe], [FeFe], [NiFe]. При этом в анаэробных организмах также экспрессируется [NiFeSe] гидрогеназа. Также гидрогеназы отличаются по TOF продукции и разложения водорода, по толерантности к кислороду и CO, а также по расположению внутри клетки.

Гидрогеназы легко поддаются адсорбции на поверхности электродов по сравнению со многими ферментными системами, что позволяет использовать методы электрохимии белковой пленки. В качестве электрода используют пиролитический графит или другой электроактивный материал [37].

В отличие от ФСП, активность гидрогеназы может быть исследована электрохимическими методами без применения медиаторов. Структура гидрогеназ хорошо исследована (PDB 1CC1, кислород-толерантная [NiFeSe] гидрогеназа из *D. baculatum*); ведутся также исследования, направленные на создание кислород-устойчивых модификаций [8].

Гидрогеназа состоит из двух субъединиц. Большая субъединица содержит реакционный центр, в то время как малая субъединица обеспечивает ток электронов с помощью трех железо-серных кластеров.

[FeFe] гидрогеназы представлены в прокариотах и, в отличие от [NiFe], в эукариотах. Между собой они отличаются аминокислотным составом и набором Fe-S кластеров. Водоросли продуцируют водород при серном голодании с помощью [FeFe] гидрогеназ при отсутствии света. Недостатком использования [FeFe] гидрогеназ является их чувствительность к кислороду, что делает невозможным их использование в сочетании с ФСП в одном реакторе. Использование протон-селективной мембраны позволяет устранить эту проблему.

По сравнению с [FeFe] гидрогеназами, которые окисляются необратимым образом, [NiFe] гидрогеназы способны выходить из неактивной фазы Ni-B в активную фазу Ni-S1a. Наиболее часто в водород-продуцирующих фотоэлектрохимических ячейках используют [NiFeSe]-гидрогеназу из *Desulfomicrobium baculatum* [29, 31, 33, 52], обладающую высокой устойчивостью к кислороду и хорошей производительностью [8, 34]. Наиболее хорошо изучены [NiFeSe]-гидрогеназы из *Desulfomicrobium baculatum*, *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F [17] и *D. vulgaris* Hildenborough [25]. При этом экспрессия функционально активной [NiFeSe]-гидрогеназы из *D. vulgaris* Miyazaki F была достигнута в *E. coli*, что существенно упрощает выделение фермента.

В отличие от синтетических катализаторов гидрогеназы на электродах имеют очень небольшой диапазон экспоненциального роста тока от перенапряжения (рис. 3) [27, 43]. К преимуществам гидрогеназ можно отнести их работу при физиологических pH, однако катализаторы НАНАТН и Ru@C<sub>2</sub>N показывают многократно большую активность. Тем не менее многие гибридные ячейки имели гидрогеназы в качестве HER катализатора [27, 33, 39].

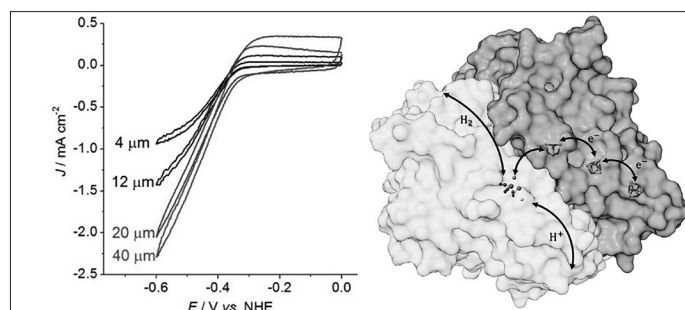


Рис. 3. Слева: вольтограммы слоев разной толщины [NiFeSe]-гидрогеназы на IO-mesoITO электроде [27], справа: схема переноса электронов, протонов и водорода в гидрогеназах. Электроны поступают к активному сайту большой субъединицы (светлая) через три железо-серных кластеров малой субъединицы (темная).

### Подходы к иммобилизации комплексов

Большое значение для эффективности фотоанода на основе ФСП имеет дизайн электродов. Так, электроды с большой поверхностной площадью и обладающие более плотным контактом с ферментами способны обеспечить большую плотность тока. Группа Рогнера [2] достигла увеличения плотности тока в  $\approx 1200$  раз по сравнению с предыдущими работами, связав электроды с ФСП с помощью Ni-NTA. На золотом электроде образовывали мономолекулярный слой из смеси тиолов. Затем к 16-Меркаптогексадекановой кислоте по карбоксильной группе присоединялся  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ -бис(карбоксиметил)-L-лизин. Таким образом формировались NTA сайты, с которыми в дальнейшем связывались Ni. Электроды с нанесенными комплексами ФСП обеспечивали

фототок  $14 \text{ мкА}/\text{см}^2$  при освещении  $\approx 100 \text{ мкмоль фотонов}/\text{м}^2\cdot\text{с}^{-1}$  и DCBQ в качестве медиатора (рис. 4).

Дальнейшие модификации электродов были направлены на увеличение поверхностной площади. Для этой цели использовались наночастицы ИТО. ИТО — прозрачный полупроводник, обладающий проводимостью, сравнимой с металлической. ИТО также обладает гидрофобными свойствами, что важно для иммобилизации мембранных ферментов. Использование электродов на основе ИТО с большой площадью поверхности (mesoИТО) дало незначительное увеличение плотности тока, поскольку большие размеры ФСП не позволяли комплексам встраиваться в значительную часть полостей пористого электрода [16]. Плотность тока, которую удалось достичь, составила  $22 \text{ мкА}\cdot\text{см}^{-2}$ .

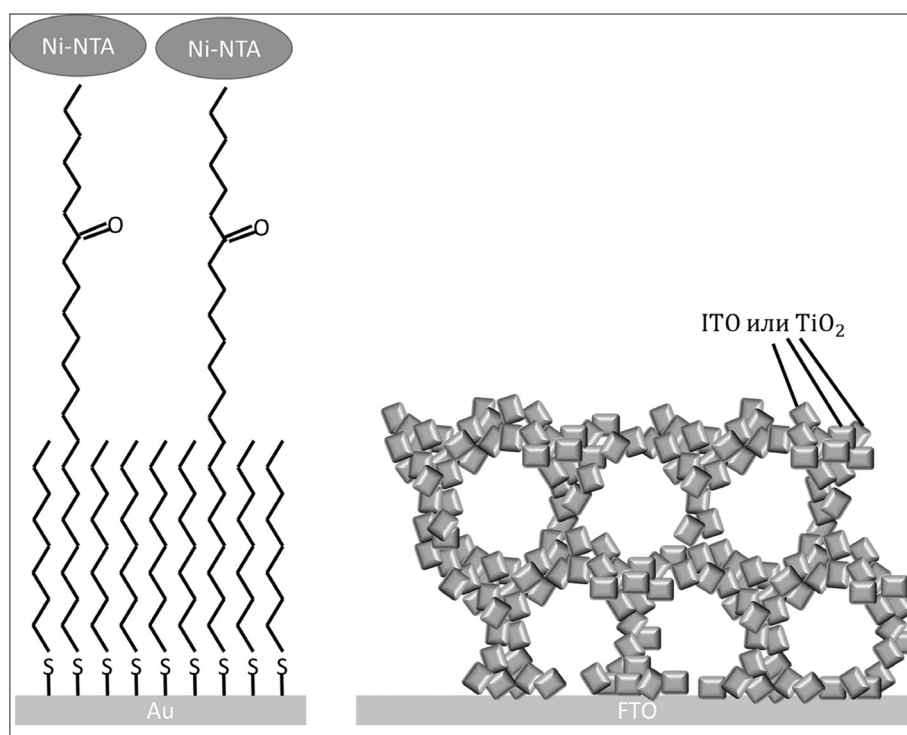


Рис. 4. Способы иммобилизации ФСП на электроде. Слева: золотой электрод с Ni-NTA для связи с ФСП по гистидиновой метке [2]. Справа: пористая структура из наночастиц ИТО/ $\text{TiO}_2$  на FTO подложке обеспечивает большую площадь поверхности для иммобилизации большого количества ферментов [4, 27]

Значительное улучшение характеристик удалось получить при использовании иерархично организованных инвертированных опалоподобных структур ИТО (IO-mesoИТО) [27]. Для изготовления таких электродов использовали полистироловые бусы ( $d=750 \text{ нм}$ ) в качестве матрицы и ИТО наночастицы ( $<50 \text{ нм}$ ). Таким образом получались поры, в которые легко заходили ФСП. Плотность тока достигала значения в  $930 \text{ мкА}\cdot\text{см}^{-2}$ . Такие токи дали возможность получить измеримое количество продуцируемого кислорода.

Вместо ИТО также используют диоксид титана [4]. В зависимости от используемого полупроводника меняется требуемое напряжение. При этом важно учитывать положения энергетических уровней всех компонентов: FeS, медиатора, материала электрода.

Еще одним компонентом, позволяющим улучшить свойства электрода, являются проводящие полимеры, такие как поли-меркапто-*p*-бензохинон (polySBQ) [49], поли-бензил виологен ( $\text{PBV}^{2+}$ ) [48], Os полимеры [3, 38]. Мономеры этих полимеров содержат циклические

соединения, обеспечивающие перенос электрона со скоростью, намного превышающей скорость диффузии. Может оказаться эффективным REDOT, ранее использованный в работе с иммобилизацией ФСИ. Важной характеристикой этих гелей является редокс-потенциал, который должен находиться ниже потенциала  $Q_A$ . В работе [49] описана фотоэлектрохимическая ячейка, в качестве катода которой использовалась билирубиноксидаза на углеродных нанотрубках. На анодной части была иммобилизована ФСИ в polySBQ геле. Детектируемая плотность тока составляла до  $120 \text{ мкА}\cdot\text{см}^{-2}$ . Максимальная мощность полученной ячейки составила  $18 \text{ мВт}\cdot\text{см}^{-2}$  при токе  $60 \text{ мкА}\cdot\text{см}^{-2}$ .

Увеличение количества ФСИ, иммобилизованной на единицу площади, целесообразно до тех пор, пока не происходит существенного снижения интенсивности света, достигающего до ферментов, находящихся в глубине. Так, для IO-mesoITO оптимальная толщина составляет около  $40 \text{ мкм}$  [27].

## Z-схемы

В зависимости от фотоанода и катода для сопряжения образования водорода и кислорода необходимо напряжение от  $350 \text{ мВ}$  до  $650 \text{ мВ}$ . Вместо приложения внешнего напряжения можно использовать фотосенсибилизированные полупроводники. Схемы, в которых акцептор от ФСИ является донором электронов для полупроводникового аналога ФСИ, называют Z-схемами. Такие схемы позволяют синтезировать водород из воды только за счет света.

Первой работой, в которой удалось создать фотоэлектрохимическую ячейку, продуцирующую водород без дополнительного напряжения, была работа Сокола и соавторов [39] (рис. 5). Исследователи использовали комбинацию из ФСИ и дикетопирролопиррола (dpp), соединенных между собой Os полимером. На IO-TiO<sub>2</sub> электрод наносили dpp, а затем смесь ФСИ и P<sub>Os</sub>. В качестве катода использовался IO-ITO с нанесенной гидрогеназой из *D. baculatum*. LSC составил  $0,14\%$ .

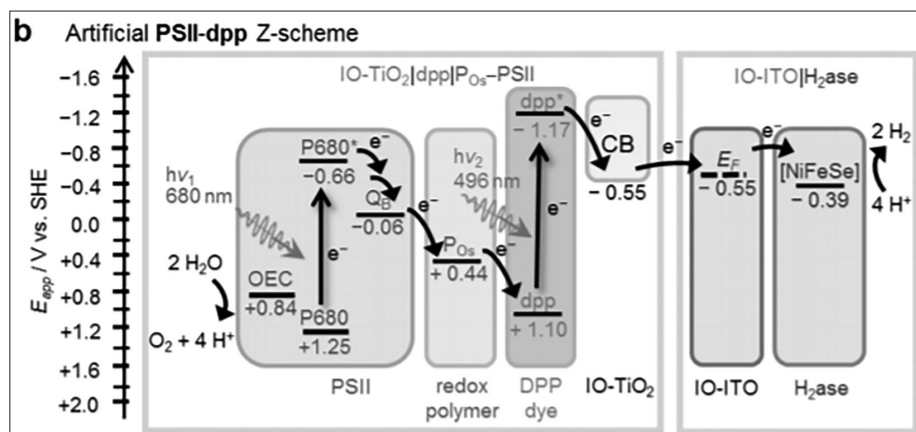


Рис. 5. Диаграмма энергетических уровней гибридной ячейки, в качестве ФСИ использован dpp-краситель на IO-TiO<sub>2</sub> подложке ([39], Supporting Information)

Одной из работ, в которой удалось осуществить продукцию водорода без дополнительного напряжения, стала работа 2017 года Жен Ли и соавторов [21]. Исследователи не стали использовать сложный дизайн электродов, а в качестве анода применили графит, погруженный в раствор с ФСИ. От ФСИ электроны переносились на графитовый электрод медиатором диметилбензохиноном. В качестве аналога ФСИ выступал FTO (fluorine doped Tin Oxide) с тонкой пленкой сульфида кадмия CdS, электроны к которому переносились от графитового электрода, соединенного с электродом в резервуаре с ФСИ, медиаторами — DMVQ и феррицианид калия. CdS — полупроводник с шириной запрещенной зоны  $2,42 \text{ эВ}$ , что делает его хорошим дополнением к ФСИ, в связи с незначительным перекрытием спектров, а с другой

стороны, позволяет получить электроны с достаточной энергией для восстановления протонов на платиновом электроде. Раствор с ФСИ был отделен от платинового электрода нафионовой мембраной, избирательно пропускающей протоны в сторону платины. К преимуществам такой ячейки можно отнести простоту устройства. LSC составил  $0,34\%$ . Недостатками ячейки является малое время жизни ФСИ в растворе и потеря энергии из-за использования системы из двух медиаторов. При использовании неиммобилизованных комплексов плотность тока ограничена диффузией медиаторов.

Аналог ФСИ может быть размещен и на катодной части. Так, исследователи [46] использовали кремниевые солнечные элементы с ITO покрытием. В качестве катализатора наносилась платина. В анодной части ячейки

находились суспензия ФСП и феррицианид калия в качестве медиатора. Катод состоял из двух типов кремния для увеличения эффективного спектра. Эффективность ячейки составила 0,29%.

Помимо электрохимических ячеек, создаются системы, содержащие все компоненты в одном растворе. В 2014 исследователям Вэнг, Чен, Ли и Тиан [45] удалось получить устойчивую продукцию водорода в растворе с мембранными фрагментами ФСП и фотокатализаторами на основе CdS и SrTiO<sub>3</sub>:Rh (допированный родием). В качестве электронного медиатора использовался феррицианид калия. Наиболее эффективной оказалась система из ФСП и ФСП-Ru/SrTiO<sub>3</sub>:Rh, производившая 2,5 моль H<sub>2</sub>/ммоль ФСП. Исследователи не привели LCC, однако по указанным в статье данным можно оценить LCC 0,06%. Недостатком систем, объединенных в одном растворе, является отсутствие разделения кислорода и водорода (рис. 6).

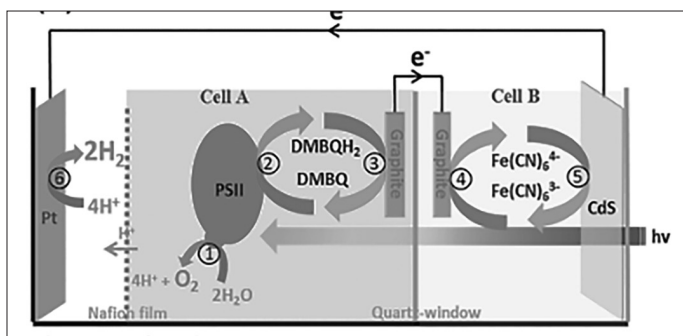


Рис. 6. Схема гибридной трехэлектродной ячейки, в качестве ФСП использован CdS на FTO подложке

### Заключение

Несмотря на значительный прогресс в создании Z-схем с ФСП, LCC остается на низком уровне. Надо учесть, что при использовании внешнего напряжения в 0,9 В LCC достигла 5,4% [27]. При этом авторы рассчитывали эффективность только ФСП, вычитая из 1,23 В приложенное напряжение; если же рассматривать суммарную эффективность, разделив энергию полученного водорода на сумму световой и электрических энергий, то получится значение около 14%. К тому же при создании Z-схем возможны варианты с параллельным и последовательным сбором света. При параллельном сборе спектры ФСП и аналога ФСП должны дополнять друг друга. Тонкие слои ФСП поглощают около 30% падающей солнечной энергии. Увеличение толщины ФСП и использование ФСП вместе с антенными комплексами теоретически может увеличить долю захваченной энергии примерно до 80%

(в диапазоне от 400 до 680 нм). Большая эффективность не возможна в силу того, что вся энергия фотона свыше 1,8 эВ рассеивается. Кроме того, увеличение толщины фотокатода приводит к снижению количества выделяемого кислорода на одну ФС. Общая эффективность системы может быть определена по формулам:

$$LCC_1 = \frac{\Delta E_{(H_2|H_2O)}}{1,8 \text{ В} + \frac{E_{med} - E_{(H_2|H^+)}}{\beta} + \eta} \text{ и}$$

$$LCC_2 = \frac{\Delta E_{(H_2|H_2O)}}{\max\left(\frac{1,8 \text{ В}}{\alpha}, \frac{E_{med} - E_{(H_2|H^+)}}{\beta} + \eta\right)},$$

где LCC<sub>1</sub> и LCC<sub>2</sub> — эффективности параллельной и последовательной систем соответственно, ΔE<sub>(H<sub>2</sub>|H<sub>2</sub>O)</sub> = E<sub>H<sub>2</sub></sub> - E<sub>H<sub>2</sub>O</sub> ≈ 1,23 В при pH=5,5, α и β — доли захваченной энергии ФСП и КПД аналога ФСП соответственно, E<sub>med</sub> — редокс-потенциал медиатора vs NHE. При α=30%, β=20%, η=0,1 В и E<sub>med</sub>=0,16 В эффективность может составить LCC<sub>1</sub>=13,5% и LCC<sub>2</sub>=20% при использовании TMBQ в качестве медиатора и коммерчески доступных кремниевых солнечных элементов. Таким образом, использование эффективных катализаторов вместо гидрогеназ и выбор соответствующих полупроводниковых элементов могут значительно увеличить эффективность существующих систем (рис. 7). Надо отметить, что приведенные формулы будут работать при отсутствии узких мест, то есть при равенстве плотностей тока фотокатода и фотоанода при испытании по отдельности. Помимо эффективности необходимо также рассматривать стабильность систем, при этом иммобилизованные ферменты сильно проигрывают полупроводниковым аналогам. Исследования принципов работы позволяет черпать идеи для создания природоподобных технологий, увеличивая стабильность систем за счет использования элементов, отсутствующих в живой природе. Учитывая прогресс в области создания OER катализаторов [5], промышленные технологии фотопродукции водорода в электрохимических ячейках скорее будут созданы на базе искусственных катализаторов, а не ферментных систем. С другой стороны, есть перспективы использования микроводорослей в качестве производителей водорода [10, 26, 41]. Увеличение продукции водорода водорослями может быть достигнуто комбинацией метаболических и генетических подходов [32]. При этом фотоэлектрохимические ячейки с иммобилизованными ферментами являются одним из ступеней исследований продукции водорода в различных режимах работы.

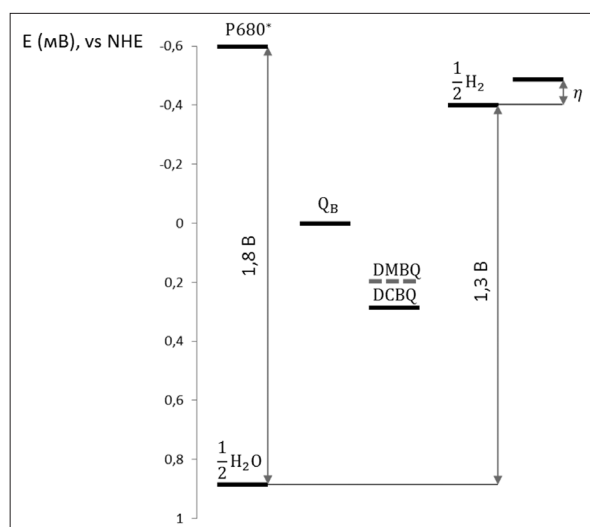


Рис. 7. Диаграмма энергетических уровней водород-продуцирующей ячейки. Повышение эффективности систем может быть достигнуто уменьшением перенапряжения и использованием медиаторов с менее положительным редокс-потенциалом. В качестве ФСИ может выступать фотоэлемент с ЭДС около 0,7 В

Работа выполнена в рамках тематического плана НИЦ «Курчатовский институт».

## Литература

1. Габдулхаков А.Г., Донцова М.В. Структурные исследования фотосистемы I1 цианобактерий // Успехи биологической химии. — 2013. — Т. 53. — С. 323–354.
2. Badura A., Esper B., Ataka K., Grunwald C., Wöll C., Kuhlmann J., Heberle J., Rögner M. Light-driven water splitting for (bio-)hydrogen production: Photosystem 2 as the central part of a bioelectrochemical device // Photochem. Photobiol. — 2006. — Vol. 82. — No. 5. — P. 1385–1390.
3. Badura A., Guschin D., Esper B., Kothe T., Neugebauer S., Schuhmann W., Rögner M. Photo-induced electron transfer between photosystem 2 via cross-linked redox hydrogels // Electroanalysis. — 2008. — Vol. 20. — No. 10. — P. 1043–1047.
4. Brinkert K., Le Formal F., Li X., Durrant J., Rutherford A.W., Fantuzzi A. Photocurrents from photosystem II in a metal oxide hybrid system: Electron transfer pathways // Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg. The Authors. — 2016. — Vol. 1857(9). — P. 1497–1505.
5. Budnikova Y.H. Recent advances in metal-organic frameworks for electrocatalytic hydrogen evolution and overall water splitting reactions // Dalt. Trans. Royal Society of Chemistry. — 2020. — Vol. 49. — No. 36. — P. 12483–12502.
6. Dau H., Zaharieva I. Principles, efficiency, and blueprint character of solar-energy conversion in photosynthetic water oxidation // Acc. Chem. Res. — 2009. — Vol. 42. — No. 12. — P. 1861–1870.
7. Duan L., Bozoglian F., Mandal S., Stewart B., Privalov T., Llobet A., Sun L. A molecular ruthenium catalyst with water-oxidation activity comparable to that of photosystem II // Nat. Chem. Nature Publishing Group. — 2012. — Vol. 4(5). — P. 418–423.
8. Evans R.M., Krahn N., Murphy B.J., Lee H., Armstrong F.A., Söll D. Selective cysteine-to-selenocysteine changes in a [NiFe]-hydrogenase confirm a special position for catalysis and oxygen tolerance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2021. — Vol. 118. — No. 13. — e2100921118.
9. Fletcher S. Discovery of a single molecule transistor in photosystem II // J. Solid State Electrochem. — 2015. — Vol. 19(1). — P. 241–250.
10. Gaffron H., Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae // J. Gen. Physiol. — 1942. — Vol. 26. — No. 2. — P. 219–240.
11. Gersten S.W., Samuels G.J., Meyer T.J. Catalytic oxidation of water by an oxo-bridged ruthenium dimer // J. Am. Chem. Soc. — 1982. — Vol. 104. — No. 14. — P. 4029–4030.
12. Gisriel C.J., Zhou K., Huang H.L., Debus R.J., Xiong Y., Brudvig G.W. Cryo-EM structure of monomeric photosystem II from *Synechocystis* sp. PCC 6803 lacking the water-oxidation complex // Joule. Elsevier Inc. — 2020. — Vol. 4(10). — P. 2131–2148.
13. Huang H., Zhao Y., Bai Y., Li F., Zhang Y., Chen Y. Conductive metal-organic frameworks with extra metallic sites as an efficient electrocatalyst for the hydrogen evolution reaction // Adv. Sci. — 2020. — Vol. 7. — No. 9. — P. 1–9.
14. Huynh M.T., Anson C.W., Cavell A.C., Stahl S.S., Hammes-Schiffer S. Quinone 1 e<sup>-</sup> and 2 e<sup>-</sup>/2 H<sup>+</sup> reduction potentials: Identification and analysis of deviations from systematic scaling relationships // J. Am. Chem. Soc. — 2016. — Vol. 138. — No. 49. — P. 15903–15910.
15. Joliet P., Joliet A. A polarographic method for detection of oxygen production and reduction of Hill reagent by isolated chloroplasts // BBA-Bioenerg. — 1968. — Vol. 153. — No. 3. — P. 625–634.
16. Kato M., Cardona T., Rutherford A.W., Reisner E. Photoelectrochemical water oxidation with photosystem II integrated in a mesoporous indium-tin oxide electrode // J. Am. Chem. Soc. — 2012. — Vol. 134(20). — P. 8332–8335.
17. Kaur A.P. Genetic and molecular characterizations of hydrogenases and sulfate metabolism proteins of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. — Düsseldorf, 2009. — 194 p.
18. Khrizanforova V., Shekurov R., Miluykov V., Khrizanforova M., Bon V., Kaskel S., Gubaidullin A., Sinyashin O., Budnikova Y. 3D Ni and Co redox-active metal-organic frameworks based on ferrocenyl diphosphinate and 4,4'-bipyridine ligands as efficient electrocatalysts for the hydrogen evolution reaction // Dalt. Trans. — 2020. — Vol. 49. — No. 9. — P. 2794–2802.
19. Kok B., Forbush B., McGloin M. Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A Linear four step mechanism // Photochem. Photobiol. — 1970. — Vol. 11(6). — P. 457–475.
20. Lee W.T., Muñoz S.B., Dickie D.A., Smith J.M. Ligand modification transforms a catalase mimic into a water oxidation catalyst // Angew. Chemie – Int. Ed. — 2014. — Vol. 53(37). — P. 9856–9859.
21. Li Z., Wang W., Ding C., Wang Z., Liao S., Li C. Biomimetic electron transport via multiredox shuttles from photosys-

- tem II to a photoelectrochemical cell for solar water splitting // *Energy Environ. Sci. Royal Society of Chemistry*. – 2017. – Vol. 10(3). – P. 765–771.
22. Liao R.Z., Siegbahn P.E.M. Quantum chemical modeling of homogeneous water oxidation catalysis // *ChemSusChem*. – 2017. – Vol. 10(22). – P. 4236–4263.
  23. Liu Y., Liu S., Wang Y., Zhang Q., Gu L., Zhao S., Xu D., Li Y., Bao J., Dai Z. Ru modulation effects in the synthesis of unique rod-like Ni@Ni<sub>2</sub>P-Ru heterostructures and their remarkable electrocatalytic hydrogen evolution performance // *J. Am. Chem. Soc.* – 2018. – Vol. 140. – No. 8. – P. 2731–2734.
  24. Mahmood J., Li F., Jung S.M., Okyay M.S., Ahmad I., Kim S.J., Park N., Jeong H.Y., Baek J.B. An efficient and pH-universal ruthenium-based catalyst for the hydrogen evolution reaction // *Nat. Nanotechnol. Nature Publishing Group*. – 2017. – Vol. 12. – No. 5. – P. 441–446.
  25. Marques M.C., Tapia C., Gutiérrez-Sanz O., Ramos A.R., Keller K.L., Wall J.D., De Lacey A.L., Matias P.M., Pereira I.A.C. The direct role of selenocysteine in [NiFeSe] hydrogenase maturation and catalysis // *Nat. Chem. Biol. Nature Publishing Group*. – 2017. – Vol. 13. – No. 5. – P. 544–550.
  26. Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi M.L., Seibert M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 122(1). – P. 127–135.
  27. Mersch D., Lee C.Y., Zhang J.Z., Brinkert K., Fontecilla-Camps J.C., Rutherford A.W., Reisner E. Wiring of photosystem II to hydrogenase for photoelectrochemical. I. Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges // *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* – 2018. – Vol. 35. – P. 134–156.
  28. Musazade E., Voloshin R., Brady N., Mondal J., Atashova S., Zharmukhamedov S.K., Huseynova I., Ramakrishna S., Najafpour M.M., Shen J.R., Bruce B.D., Allakhverdiev S.I. Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges // *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* – 2018. – Vol. 35. – P. 134–156.
  29. Nam D.H., Zhang J.Z., Andrei V., Kornienko N., Heidary N., Wagner A., Nakanishi K., Sokol K.P., Slater B., Zebger I., Hofmann S., Fontecilla-Camps J.C., Park C.B., Reisner E. Solar water splitting with a hydrogenase integrated in photoelectrochemical tandem cells // *Angew. Chemie – Int. Ed.* – 2018. – Vol. 57. – No. 33. – P. 10595–10599.
  30. Pearce O.M., Duncan J.S., Lama B., Dukovic G., Damrauer N.H. Binding orientation of a ruthenium-based water oxidation catalyst on a CdS QD surface revealed by NMR spectroscopy // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 11(22). – P. 9552–9556.
  31. Reisner E., Fontecilla-Camps J.C., Armstrong F.A. Catalytic electrochemistry of a [NiFeSe]-hydrogenase on TiO<sub>2</sub> and demonstration of its suitability for visible-light driven H<sub>2</sub> production // *Chem. Commun.* – 2009. – No. 5. – P. 550–552.
  32. Sadvakasova A.K., Kossalbayev B.D., Zayadan B.K., Bolatkhan K., Alwasel S., Najafpour M.M., Tomo T., Allakhverdiev S.I. Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacteria cells and possible ways to increase their productivity // *Renew. Sustain. Energy Rev. Elsevier Ltd.* – 2020. – Vol. 133. – P. 110054.
  33. Sakai T., Mersch D., Reisner E. Photocatalytic hydrogen evolution with a hydrogenase in a mediator-free system under high levels of oxygen // *Angew. Chemie – Int. Ed.* – 2013. – Vol. 52. – No. 47. – P. 12313–12316.
  34. Schäfer C., Bommer M., Hennig S.E., Jeoung J.H., Dobbek H., Lenz O. Structure of an actinobacterial-type [NiFe]-hydrogenase reveals insight into O<sub>2</sub>-tolerant H<sub>2</sub> oxidation // *Structure*. – 2016. – Vol. 24. – No. 2. – P. 285–292.
  35. Sheng X., Watanabe A., Li A., Kim E., Song C., Murata K., Song D., Minagawa J., Liu Z. Structural insight into light harvesting for photosystem II in green algae // *Nat. Plants. Springer US*. – 2019. – Vol. 5. – No. 12. – P. 1320–1330.
  36. Shinagawa T., Garcia-Esparza A.T., Takanabe K. Insight on Tafel slopes from a microkinetic analysis of aqueous electrocatalysis for energy conversion // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*. – 2015. – Vol. 5. – P. 1–21.
  37. Sickerman N.S., Hu Y. Hydrogenases / In *Metalloproteins: Methods and Protocols* (Ed. Hu Y.). Part of the «Methods in Molecular Biology» book series (MIMB, Vol. 1876) [Springer Protocols]. – Humana Press, 2018. – P. 65–88.
  38. Sokol K.P., Mersch D., Hartmann V., Zhang J.Z., Nowaczyk M.M., Rögner M., Ruff A., Schuhmann W., Plumeré N., Reisner E. Rational wiring of photosystem II to hierarchical indium tin oxide electrodes using redox polymers // *Energy Environ. Sci.* – 2016. – Vol. 9. – No. 12. – P. 3698–3709.
  39. Sokol K.P., Robinson W.E., Warnan J., Kornienko N., Nowaczyk M.M., Ruff A., Zhang J.Z., Reisner E. Bias-free photoelectrochemical water splitting with photosystem II on a dye-sensitized photoanode wired to hydrogenase // *Nat. Energy. Springer US*. – 2018. – Vol. 3. – No. 11. – P. 944–951.
  40. Tan T.L., Wang L.L., Zhang J., Johnson D.D., Bai K. Platinum nanoparticle during electrochemical hydrogen evolution: Adsorbate distribution, active reaction species, and size effect // *ACS Catal.* – 2015. – Vol. 5. – No. 4. – P. 2376–2383.
  41. Touloupakis E., Torzillo G. Photobiological hydrogen production / In *Solar Hydrogen Production: Processes, Systems and Technologies*. – Elsevier, 2019. – P. 511–525.
  42. Umena Y., Kawakami K., Shen J.R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å // *Nature*. – 2011. – Vol. 473. – No. 7345. – P. 55–60.
  43. Vincent K.A., Parkin A., Armstrong F.A. Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases // *Chem. Rev.* – 2007. – Vol. 107. – No. 10. – P. 4366–4413.
  44. Viruwuru V., Fragata M. Photochemical cooperativity in photosystem II. Characterization of oxygen evolution discontinuities in the light-response curves // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2008. – Vol. 10. – No. 44. – P. 6607–6614.
  45. Wang W., Chen J., Li C., Tian W. Achieving solar overall water splitting with hybrid photosystems of photosystem II and artificial photocatalysts // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1–8.
  46. Wang W., Wang H., Zhu Q., Qin W., Han G., Shen J., Zong X., Li C. Spatially separated photosystem II and a



- silicon photoelectrochemical cell for overall water splitting: A natural-artificial photosynthetic hybrid // *Angew. Chemie.* – 2016. – Vol. 128. – No. 32. – P. 9375–9379.
47. Xia X., Song M., Wang H., Zhang X., Sui N., Zhang Q., Colvin V.L., Yu W.W. Latest progress in constructing solid-state Z scheme photocatalysts for water splitting // *Nanoscale.* Royal Society of Chemistry. – 2019. – Vol. 11(23). – P. 11071–11082.
  48. Yehezkeili O., Tel-Vered R., Michaeli D., Nechushtai R., Willner I. Photosystem I (PSI)/Photosystem II (PSII)-based photo-bioelectrochemical cells revealing directional generation of photocurrents // *Small.* – 2013. – Vol. 9. – No. 17. – P. 2970–2978.
  49. Yehezkeili O., Tel-Vered R., Wasserman J., Trifonov A., Michaeli D., Nechushtai R., Willner I. Integrated photosystem II-based photo-bioelectrochemical cells // *Nature Communications.* – 2012. – Vol. 3. – Article 742. doi: 10.1038/ncomms1741.
  50. Yukesh Kannah R., Kavitha S., Preethi, Parthiba Karthikeyan O., Kumar G., Dai-Viet N.V., Rajesh Banu J. Techno-economic assessment of various hydrogen production methods – A review // *Bioresource Technology.* – 2021. – Vol. 319. – 124175. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124175.
  51. Zhang D., Stojanovic M., Ren Y., Cao Y., Eickemeyer F.T., Socie E., Vlachopoulos N., Moser J.E., Zakeeruddin S.M., Hagfeldt A., Grätzel M. A molecular photosensitizer achieves a  $V_{oc}$  of 1.24 V enabling highly efficient and stable dye-sensitized solar cells with copper(II/I)-based electrolyte // *Nature Communications.* – 2021. – Vol. 12. – No. 1. – P. 1777 (1–10). doi: 10.1038/s41467-021-21945-3.
  52. Zhang J.Z., Reisner E. Advancing photosystem II photoelectrochemistry for semi-artificial photosynthesis // *Nature Reviews Chemistry.* – 2020. – Vol. 4(1). – P. 1–16. doi: 10.1038/s41570-019-0149-4.
  53. Zhang X.P., Wang H.Y., Zheng H., Zhang W., Cao R. O–O bond formation mechanisms during the oxygen evolution reaction over synthetic molecular catalysts // *Chinese Journal of Catalysis.* – 2021. – Vol. 42. – No. 8. – P. 1253–1268.
  54. Zhu J., Hu L., Zhao P., Lee L.Y.S., Wong K.Y. Recent advances in electrocatalytic hydrogen evolution using nanoparticles // *Chem. Rev.* – 2020. – Vol. 120. – No. 2. – P. 851–918. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00248.
  4. Brinkert K, Le Formal F, Li X, Durrant J, Rutherford AW, Fantuzzi A. Photocurrents from photosystem II in a metal oxide hybrid system: Electron transfer pathways. *Biochim Biophys Acta – Bioenerg.* The Authors 2016; 1857(9):1497–1505.
  5. Budnikova YH. Recent advances in metal-organic frameworks for electrocatalytic hydrogen evolution and overall water splitting reactions. *Dalt Trans Royal Society of Chemistry* 2020; 49(36):12483–12502.
  6. Dau H, Zaharieva I. Principles, efficiency, and blueprint character of solar-energy conversion in photosynthetic water oxidation. *Acc Chem Res* 2009; 42(12):1861–1870.
  7. Duan L, Bozoglian F, Mandal S, Stewart B, Privalov T, Llobet A, Sun L. A molecular ruthenium catalyst with water-oxidation activity comparable to that of photosystem II. *Nat Chem Nature Publishing Group* 2012; 4(5):418–423.
  8. Evans RM, Krahn N, Murphy BJ, Lee H, Armstrong FA, Söll D. Selective cysteine-to-selenocysteine changes in a [NiFe]-hydrogenase confirm a special position for catalysis and oxygen tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021; 118(13):e2100921118.
  9. Fletcher S. Discovery of a single molecule transistor in photosystem II. *J Solid State Electrochem* 2015; 19(1):241–250.
  10. Gaffron H, Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J Gen Physiol* 1942; 26(2):219–240.
  11. Gersten SW, Samuels GJ, Meyer TJ. Catalytic oxidation of water by an oxo-bridged ruthenium dimer. *J Am Chem Soc* 1982; 104(14):4029–4030.
  12. Gisriel CJ, Zhou K, Huang HL, Debus RJ, Xiong Y, Brudvig GW. Cryo-EM structure of monomeric photosystem II from *Synechocystis* sp. PCC 6803 lacking the water-oxidation complex. *Joule.* Elsevier Inc 2020; 4(10):2131–2148.
  13. Huang H, Zhao Y, Bai Y, Li F, Zhang Y, Chen Y. Conductive metal-organic frameworks with extra metallic sites as an efficient electrocatalyst for the hydrogen evolution reaction. *Adv Sci* 2020; 7(9):1–9.
  14. Huynh MT, Anson CW, Cavell AC, Stahl SS, Hammes-Schiffer S. Quinone 1 e<sup>-</sup> and 2 e<sup>-</sup>/2 H<sup>+</sup> reduction potentials: Identification and analysis of deviations from systematic scaling relationships. *J Am Chem Soc* 2016; 138(49):15903–15910.
  15. Joliot P, Joliot A. A polarographic method for detection of oxygen production and reduction of Hill reagent by isolated chloroplasts. *BBA-Bioenerg* 1968; 153(3):625–634.
  16. Kato M, Cardona T, Rutherford AW, Reisner E. Photoelectrochemical water oxidation with photosystem II integrated in a mesoporous indium-tin oxide electrode. *J Am Chem Soc* 2012; 134(20):8332–8335.
  17. Kaur AP. Genetic and molecular characterizations of hydrogenases and sulfate metabolism proteins of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Düsseldorf,* 2009: 194.
  18. Khrizanforova V, Shekurov R, Miluykov V, Khrizanforov M, Bon V, Kaskel S, Gubaidullin A, Sinyashin O, Budnikova Y. 3D Ni and Co redox-active metal-organic frameworks based on ferrocenyl diphosphinate and 4,4'-bipyridine ligands as efficient electrocatalysts for the hydrogen evolution reaction. *Dalt Trans* 2020; 49(9):2794–2802.

## References

1. Gabdulkhakov AG, Dontsova MV. Strukturnyye issledovaniya fotosistemy Ii tsianobakteriy. *Uspekhi biologicheskoy khimii* 2013; 53:323–354 (in Russian).
2. Badura A, Esper B, Ataka K, Grunwald C, Wöll C, Kuhlmann J, Heberle J, Rögner M. Light-driven water splitting for (bio-)hydrogen production: Photosystem 2 as the central part of a bioelectrochemical device. *Photochem Photobiol* 2006; 82(5):1385–1390.
3. Badura A, Guschin D, Esper B, Kothe T, Neugebauer S, Schuhmann W, Rögner M. Photo-induced electron transfer between photosystem 2 via cross-linked redox hydrogels. *Electroanalysis* 2008; 20(10):1043–1047.

19. Kok B, Forbush B, McGloin M. Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A Linear four step mechanism. *Photochem Photobiol* 1970; 11(6):457–475.
20. Lee WT, Muñoz SB, Dickie DA, Smith JM. Ligand modification transforms a catalase mimic into a water oxidation catalyst. *Angew. Chemie – Int Ed* 2014; 53(37):9856–9859.
21. Li Z, Wang W, Ding C, Wang Z, Liao S, Li C. Biomimetic electron transport via multiredox shuttles from photosystem II to a photoelectrochemical cell for solar water splitting. *Energy Environ. Sci Royal Society of Chemistry* 2017; 10(3):765–771.
22. Liao RZ, Siegbahn PEM. Quantum chemical modeling of homogeneous water oxidation catalysis. *ChemSusChem* 2017; 10(22):4236–4263.
23. Liu Y, Liu S, Wang Y, Zhang Q, Gu L, Zhao S, Xu D, Li Y, Bao J, Dai Z. Ru modulation effects in the synthesis of unique rod-like Ni@Ni<sub>2</sub>P-Ru heterostructures and their remarkable electrocatalytic hydrogen evolution performance. *J Am Chem Soc* 2018; 140(8):2731–2734.
24. Mahmood J, Li F, Jung SM, Okyay MS, Ahmad I, Kim SJ, Park N, Jeong HY, Baek JB. An efficient and pH-universal ruthenium-based catalyst for the hydrogen evolution reaction. *Nat Nanotechnol Nature Publishing Group* 2017; 12(5):441–446.
25. Marques MC, Tapia C, Gutiérrez-Sanz O, Ramos AR, Keller KL, Wall JD, De Lacey AL, Matias PM, Pereira IAC. The direct role of selenocysteine in [NiFeSe] hydrogenase maturation and catalysis. *Nat Chem Biol Nature Publishing Group* 2017; 13(5):544–550.
26. Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 2000; 122(1):127–135.
27. Mersch D, Lee CY, Zhang JZ, Brinkert K, Fontecilla-Camps JC, Rutherford AW, Reisner E. Wiring of photosystem II to hydrogenase for photoelectrochemical. I. Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* 2018; 35:134–156.
28. Musazade E, Voloshin R, Brady N, Mondal J, Atashova S, Zharmukhamedov SK, Huseynova I, Ramakrishna S, Najafpour MM, Shen JR, Bruce BD, Allakhverdiev SI. Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges. *J Photochem Photobiol C: Photochem Rev* 2018; 35:134–156.
29. Nam DH, Zhang JZ, Andrei V, Kornienko N, Heidary N, Wagner A, Nakanishi K, Sokol KP, Slater B, Zebger I, Hofmann S, Fontecilla-Camps JC, Park CB, Reisner E. Solar water splitting with a hydrogenase integrated in photoelectrochemical tandem cells. *Angew Chemie – Int Ed* 2018; 57(33):10595–10599.
30. Pearce OM, Duncan JS, Lama B, Dukovic G, Damrauer NH. Binding orientation of a ruthenium-based water oxidation catalyst on a CdS QD surface revealed by NMR spectroscopy. *J Phys Chem Lett* 2020; 11(22):9552–9556.
31. Reisner E, Fontecilla-Camps JC, Armstrong FA. Catalytic electrochemistry of a [NiFeSe]-hydrogenase on TiO<sub>2</sub> and demonstration of its suitability for visible-light driven H<sub>2</sub> production. *Chem Commun* 2009(5):550–552.
32. Sadvakasova AK, Kossalbayev BD, Zayadan BK, Bolatkhan K, Alwasel S, Najafpour MM, Tomo T, Allakhverdiev SI. Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacteria cells and possible ways to increase their productivity. *Renew Sustain Energy Rev Elsevier Ltd* 2020; 133:110054.
33. Sakai T, Mersch D, Reisner E. Photocatalytic hydrogen evolution with a hydrogenase in a mediator-free system under high levels of oxygen. *Angew Chemie – Int Ed* 2013; 52(47):12313–12316.
34. Schäfer C, Bommer M, Hennig SE, Jeoung JH, Dobbek H, Lenz O. Structure of an actinobacterial-type [NiFe]-hydrogenase reveals insight into O<sub>2</sub>-tolerant H<sub>2</sub> oxidation. *Structure* 2016; 24(2):285–292.
35. Sheng X, Watanabe A, Li A, Kim E, Song C, Murata K, Song D, Minagawa J, Liu Z. Structural insight into light harvesting for photosystem II in green algae. *Nat Plants Springer US* 2019; 5(12):1320–1330.
36. Shinagawa T, Garcia-Esparza AT, Takanabe K. Insight on Tafel slopes from a microkinetic analysis of aqueous electrocatalysis for energy conversion. *Sci Rep Nature Publishing Group* 2015; 5:1–21.
37. Sickerman NS, Hu Y. Hydrogenases / In *Metalloproteins: Methods and Protocols* (Ed Hu Y). Part of the «Methods in Molecular Biology» book series (MIMB, Vol. 1876) [Springer Protocols]. Humana Press, 2018:65–88.
38. Sokol KP, Mersch D, Hartmann V, Zhang JZ, Nowaczyk MM, Rögner M, Ruff A, Schuhmann W, Plumeré N, Reisner E. Rational wiring of photosystem II to hierarchical indium tin oxide electrodes using redox polymers. *Energy Environ Sci* 2016; 9(12):3698–3709.
39. Sokol KP, Robinson WE, Warnan J, Kornienko N, Nowaczyk MM, Ruff A, Zhang JZ, Reisner E. Bias-free photoelectrochemical water splitting with photosystem II on a dye-sensitized photoanode wired to hydrogenase. *Nat Energy Springer US* 2018; 3(11):944–951.
40. Tan TL, Wang LL, Zhang J, Johnson DD, Bai K. Platinum nanoparticle during electrochemical hydrogen evolution: Adsorbate distribution, active reaction species, and size effect. *ACS Catal* 2015; 5(4):2376–2383.
41. Touloupakis E, Torzillo G. Photobiological hydrogen production / In *Solar Hydrogen Production: Processes, Systems and Technologies*. – Elsevier, 2019:511–525.
42. Umena Y, Kawakami K, Shen JR, Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 2011; 473(7345):55–60.
43. Vincent KA, Parkin A, Armstrong FA. Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem. Rev* 2007; 107(10):4366–4413.
44. Viruvuru V, Fragata M. Photochemical cooperativity in photosystem II. Characterization of oxygen evolution discontinuities in the light-response curves. *Phys Chem Chem Phys* 2008; 10(44):6607–6614.
45. Wang W, Chen J, Li C, Tian W. Achieving solar overall water splitting with hybrid photosystems of photosystem II and artificial photocatalysts. *Nat Commun* 2014; 5:1–8.

46. Wang W, Wang H, Zhu Q, Qin W, Han G, Shen J, Zong X, Li C. Spatially separated photosystem II and a silicon photoelectrochemical cell for overall water splitting: A natural-artificial photosynthetic hybrid. *Angew Chemie* 2016; 128(32):9375–9379.
47. Xia X, Song M, Wang H, Zhang X, Sui N, Zhang Q, Colvin VL, Yu WW. Latest progress in constructing solid-state Z scheme photocatalysts for water splitting. *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry 2019; 11(23):11071–11082.
48. Yehezkeili O, Tel-Vered R, Michaeli D, Nechushtai R, Willner I. Photosystem I (PSI)/Photosystem II (PSII)-based photo-bioelectrochemical cells revealing directional generation of photocurrents. *Small* 2013; 9(17):2970–2978.
49. Yehezkeili O, Tel-Vered R, Wasserman J, Trifonov A, Michaeli D, Nechushtai R, Willner I. Integrated photosystem II-based photo-bioelectrochemical cells. *Nature Communications* 2012; 3:742. doi: 10.1038/ncomms1741.
50. Yukesh Kannah R, Kavitha S, Preethi, Parthiba Karthikeyan O, Kumar G, Dai-Viet NV, Rajesh Banu J. Techno-economic assessment of various hydrogen production methods — A review. *Bioresource Technology* 2021; 319 1241;5. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124175.
51. Zhang D, Stojanovic M, Ren Y, Cao Y, Eickemeyer FT, Socie E, Vlachopoulos N, Moser JE, Zakeeruddin SM, Hagfeldt A, Grätzel M. A molecular photosensitizer achieves a  $V_{oc}$  of 1.24 V enabling highly efficient and stable dye-sensitized solar cells with copper(II/I)-based electrolyte. *Nature Communications* 2021; 12(1):1777 (1–10). doi: 10.1038/s41467-021-21945-3.
52. Zhang JZ, Reisner E. Advancing photosystem II photoelectrochemistry for semi-artificial photosynthesis. *Nature Reviews Chemistry* 2020; 4(1):1–16. doi: 10.1038/s41570-019-0149-4.
53. Zhang XP, Wang HY, Zheng H, Zhang W., Cao R. O–O bond formation mechanisms during the oxygen evolution reaction over synthetic molecular catalysts. *Chinese Journal of Catalysis* 2021; 42(8):1253–1268.
54. Zhu J, Hu L, Zhao P, Lee LYS, Wong KY. Recent advances in electrocatalytic hydrogen evolution using nanoparticles. *Chem Rev* 2020; 120(2):851–918. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00248.

## PHOTOELECTRIC CELLS BASED ON PHOTOSYSTEM II FOR HYDROGEN PRODUCTION

I.A. DORONIN<sup>1</sup>, T.N. GAEVA<sup>1</sup>, S.I. ALLAKHVERDIEV<sup>2</sup>, R.G. VASILOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Research Centre «Kurchatov Institute»,

<sup>2</sup> K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow

Photosystem II (PSII) effectively splits water using light energy. This review discusses approaches to the design of PSII-based photovoltaic cells for hydrogen production. Various approaches to the immobilization of PSII both in gels and on solid substrates are discussed. Artificial and protein catalysts for the production of hydrogen at the cathode are described. Particular attention is paid to the selection of mediators that provide effective conjugation of processes at the anode and cathode; various versions of the Z-scheme are given. In addition to schemes with electrochemical coupling of photoreactions, systems with direct electron transfer along molecular wires are also of interest. The article also analyzes the main limitations for hybrid photosynthesis and possible approaches to their resolution.

**Keywords:** Photosystem II, biohydrogen, photovoltaic cells, Z-scheme, hybrid photosynthesis, MOF.

### Address:

Doronin I.A.

Postgraduate student of the Department of Biotechnology and Bioenergy,

National Research Centre «Kurchatov Institute»

E-mail: iadoronin@yandex.ru

### Для цитирования:

Доронин И.А., Гаева Т.Н., Аллахвердиев С.И., Василов Р.Г. Фотоэлектрические ячейки на основе Фотосистемы II для продукции водорода. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2021; 17(3):46–59.

### For citation:

Doronin I.A., Gaeva T.N., Allakhverdiev S.I., Vasilov R.G. Photoelectric cells based on Photosystem II for hydrogen production. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(3): 46–59 (in Russian).

## АСПЕКТЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

А.В. ТЮРИНА\*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, М.П. ПОГОЖОВА, А.О. АНОПРИЕНКО

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону*

В обзоре рассматривается вопрос о создании экспериментальных профилактических препаратов на основе холерных бактериофагов. Анализ состояния проблемы свидетельствует в пользу необходимости поиска новых возможностей фагопрофилактики холеры. При создании новых профилактических холерных препаратов следует учитывать их положительные и отрицательные результаты по их применению с профилактической целью. На основании анализа сделан вывод, что для использования бактериофагов для профилактики холеры необходимо совершенствование технологического процесса получения холерных фаголизатов с высоким титром вирусных частиц и введение этапов специфической очистки от холерного токсина. С помощью молекулярно-генетических методов надо подтверждать вирулентную природу используемых бактериофагов, отсутствие генов патогенности в фаговых геномах, что позволит обеспечить высокий уровень безопасности и эффективности противохолерных фаговых препаратов. Многочисленные исследования, проведенные *in vivo* и *in vitro*, подтвердили безопасность и эффективность холерных бактериофагов при профилактике холеры.

*Ключевые слова:* холерные бактериофаги, конструирование, профилактика холеры.

Интерес к бактериофагам вызван многими причинами, основными из которых являются: разработка эффективных методов фаготерапии и фагопрофилактики возбудителей инфекционных болезней, их использование для решения вопросов взаимоотношения вируса с бактериальной клеткой, действия инактивирующих факторов на фаги и изменчивости свойств бактерий при передаче генетической информации фагами [13].

В мире с 1917 по 1956 гг. было опубликовано более 800 работ по профилактике и лечению различных инфекций бактериофагами. Однако зарубежными исследователями были недостаточно изучены биология и жизненный цикл фагов, слабо развиты процедуры очистки и хранения, приводящие к низким титрам активных бактериофагов в терапевтических препаратах и к загрязнению бактериальными антигенами хозяина. Также были допущены ошибки при выборе терапевтических фагов, которые не были эффективными против бактерий-мишеней [1]. За рубежом эра фаготерапии закончилась после открытия пенициллина, в СССР (1940–1990-е

годы) фаги успешно применялись как лекарственные препараты [2].

В республиках СССР фаготерапия активно развивалась, начиная с 1930 года [1]. Так, бактериофаговые препараты широко использовались с профилактической целью в различных регионах нашей страны, эндемичных по инфекционным заболеваниям, а также в организованных коллективах, где могли возникнуть вспышки различных инфекций [2]. Разработанные в 1930-е годы в СССР иммунобиологические лекарственные препараты (ИБЛП) на основе бактериофагов в настоящее время широко применяются для лечения острых кишечных и пищевых токсикоинфекций, гнойно-септических и других заболеваний [3, 11].

Основными преимуществами фаговой терапии являются: строгое селективное действие; отсутствие влияния на физиологическую микрофлору; стимуляция факторов специфического и неспецифического иммунитета (что особенно значимо при лечении рецидивирующих воспалительных заболеваний); возможность применения у пациентов с аллергическими реакциями на антибиотики; полная совместимость с любыми лекарственными средствами; отсутствие токсических эффектов; безопасность приема во время беременности; отсутствие побочных действий; сокращение длительности лечения за счет быстрого действия и глубокого проникновения в очаг инфекции [4, 45, 48].

© 2021 г. Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Аноприенко А.О.

\* Автор для переписки:

Тюрина Анна Владимировна  
младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов. ФКУЗ  
Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
E-mail: tyurina.anuta2010@yandex.ru

Бактериофаги связаны с определенным бактериальным штаммом и проявляют сильную бактерицидную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Важным аспектом фаговой терапии представляется строгая специфичность фагов, которая очень узка и ограничена одним или несколькими видами близкородственных бактерий, что позволяет, в свою очередь, устранить конкретный микроорганизм, не нарушая всего бактериального сообщества человеческого организма. Однако при необходимости экстренного лечения надо иметь препарат, поражающий сразу несколько видов бактерий, возможных возбудителей инфекции. Для решения этой проблемы применяют коктейли фагов — препараты, содержащие несколько фагов, отличающихся по специфичности [4]. Доказательства безопасности терапии и профилактики бактериофагами были подтверждены многими клиническими испытаниями, включающими в себя местное и пероральное введение фаговых коктейлей [10, 28, 33].

В настоящее время бактериофаги применяют не только для терапии и профилактики инфекционных болезней, но и используют для обработки в лечебно-профилактических учреждениях [14], в детских и воинских коллективах, применяют в косметологии, бытовой химии, в сфере общественного питания, а также проводят санитарные мероприятия сельскохозяйственных культур и животных [24]. В России производится спрей для рук с бактериофагами и пребиотиками, обладающий заживляющим и антибактериальным действием [26]. В Белоруссии изучается перспективность использования бактериофагов в составе моющих средств с пробиотическими свойствами [16]. В российских и западных источниках описывается использование бактериофагов в качестве пищевых добавок и других форм фагосодержащих средств, применение которых одобрено Управлением по контролю над продуктами и препаратами и другими регулирующими органами по всему миру [3, 37]. В РФ зарегистрирован и выпускается ряд монопрепаратов бактериофагов для терапии и профилактики многих инфекционных заболеваний, вызванных патогенными возбудителями (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *Enterococcus* spp., *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, и др.) [17].

Производство препаратов бактериофагов базируется на ряде критериев, а именно: строгая вирулентность бактериофагов, так как умеренные фаги играют существенную роль в эволюции бактерий, способствуя приобретению возбудителями дополнительных факторов вирулентности [18], обеспечивая воспроизводимость в клетке-хозяина с высоким выходом активных частиц

[37], а также сохранение литической активности при длительном хранении и отсутствие взаимодействия с представителями нормальной микробиоты человека [18, 24]. Процесс взаимодействия вирулентного бактериофага с клеткой складывается из нескольких стадий — адсорбции, проникновения в клетку, биосинтеза нуклеиновой кислоты и белков, сборки и выхода из клетки. Основные механизмы биологического взаимодействия микробной клетки и бактериофага были расшифрованы в значительной мере благодаря исследованию вирусов бактерий, структур и функций генетического материала, которые изучены в настоящее время достаточно подробно на бактериофагах кишечной группы бактерий [3].

На этапе 7 пандемии холеры активное распространение получили штаммы холерных вибрионов с множественной устойчивостью к антимикробным препаратам и биоцидам, что значительно осложняет борьбу с этим инфекционным заболеванием и приводит к резкому ухудшению эпидемиологической ситуации во многих странах мира [25]. Сейчас существует большая угроза возникновения различных чрезвычайных ситуаций биолого-социального характера, имеющих международное значение и проявляющихся в виде масштабных эпидемий и вспышек этой инфекции [22]. Сезонные подъемы заболеваемости и вынос инфекции с эндемичных территорий с возможным формированием временных вторичных очагов холеры свидетельствуют о необходимости создания новых подходов в профилактике холеры [20].

Для лечения холеры используется регидратационная терапия, а с помощью антибиотиков можно уменьшить интенсивность и продолжительность клинических симптомов и выделения каловых масс [39]. Однако нарушение проведения схем антибактериальной терапии приводит к росту антибиотикорезистентных штаммов холерных вибрионов. Устойчивость к антибактериальным препаратам и биоцидам связана с бесконтрольным и неэффективным их использованием при лечении и профилактике холеры и других заболеваний [35], а также с их массовым применением в пищевой промышленности и сельском хозяйстве [19]. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения рекомендует лечить антибактериальными препаратами только тяжелые случаи холеры и использовать профилактические меры, включающие в себя вакцинации [27]. Антибиотики, подавляя рост условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, угнетают и нормальную микрофлору человека, вызывая аллергические реакции и иммунодефицитное состояние [9].

В настоящее время в мире зарегистрировано несколько противохолерных вакцин: Dukoral® (Швеция,

1991 г.), mORC-VAX (Вьетнам, 1997/2009 г.), Shanchol™ (Индия, 2009 г.), Euvichol® (Корея, 2015 г.), Vaxchora™ (США, 2017 г.) [5]. Но, несмотря на очевидные успехи в вакцинации против холеры, необходимо проведение дальнейших исследований с целью улучшения качества, создание «удобных» форм выпуска и повышение стабильности вакцин при хранении и транспортировке при высоких температурах. Также для применения вакцин имеются ограничения по возрасту, противопоказания и побочные эффекты [8]. В сложившейся ситуации альтернативу вакцинам и антимикробным препаратам в профилактике холеры могут составить природные биологические агенты — бактериофаги [34].

Несмотря на успешное производство и применение бактериофагов для многих инфекций [17], в арсенале коммерческих профилактических препаратов отсутствуют холерные бактериофаги [7]. Анализ состояния проблемы свидетельствует в пользу необходимости поиска новых возможностей фагопрофилактики холеры [25], что, в свою очередь, поставило перед нами задачу по созданию авторского алгоритма разработки специализированного продукта профилактического питания на основе холерных бактериофагов. При создании новых профилактических холерных препаратов нужно учитывать их положительные и отрицательные результаты по их применению при профилактике холеры, так как на сегодняшний день фаговая профилактика имеет значительный потенциал для туристов, посещающих страны с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой по холере.

Необходимо отметить, что в настоящее время в мире продолжают исследования по фаготерапии и фагопрофилактики холеры в опытах *in vivo* и *in vitro*. Y. Wei et al. (2010) предположили, что уменьшение вспышек холеры связано с увеличением плотности выделенного литического бактериофага, что, в свою очередь, подтверждено на математической модели [47].

Так, исследования Bhandare S. et al. (2019) *in vivo* экспериментальной холеры показали, что пероральное введение одного фага семейства *Podoviridae* может предотвратить клинические симптомы холеры у новорожденных кроликов без развития устойчивости к фагам [29]. Данные результаты указывают на то, что один правильно подобранный вирулентный фаг в высоком титре эффективен для уничтожения холерных вибрионов в отделах кишечника как до, так и после заражения, а также может как уменьшить тяжесть заболевания, так и ограничить распространение микроорганизма в окружающей среде [36, 38].

Yen M. et al. (2017) проведены исследования, направленные на использование для лечения холеры коктейля из трех фагов (ICP). Авторы зарегистрировали снижение заболеваемости и выделения *V. cholerae* у биомоделей (кроликов), получавших коктейль из фагов. Однако при применении монофага исследователями были выявлены устойчивые к фагам мутанты. Профили чувствительности пассированных *in vivo* штаммов *V. cholerae* к отдельным фагам, присутствующим в коктейле ICP, продемонстрировали, что устойчивость различается в зависимости от биомодели, а также времени воздействия. Также установлено, что все фаги, использованные в исследовании, относились к семейству *Podoviridae* [49].

Кроме того, бактериофаги могут эффективно дополнять антибиотикотерапию, способствуя разрушению бактерий в случае образования ими биопленки и препятствуя ее образованию на начальных этапах [48].

Препараты фага могут быть получены с использованием лиофилизации, распылительной сушки, эмульгирования и микрокапсулирования, которые остаются стабильными в течение многих лет [41].

Для создания профилактических препаратов холерных бактериофагов следует учитывать не только современный опыт работы на биомоделях, но и исследования XX столетия по фаговой терапии холеры, проведенные на больных. L.M. Marcuk et al. (1971) [42] провели регидратационную терапию больных холерой стандартным раствором для внутривенного введения, а затем в дополнение к поддерживающей внутривенной терапии вводили препарат бактериофага; кроме того, некоторым пациентам вводили большие дозы препарата фага внутримышечно. Для контроля применяли стандартный режим приема тетрациклина или препарат плацебо. Критериями, используемыми для оценки различных методов лечения, служили продолжительность диареи, объем стула и продолжительность выделения вибрионов. Результаты этой работы демонстрируют низкий терапевтический эффект в используемых дозах бактериофага. Также нужно отметить эксперимент К.А. Monsur et al. (1970) [43], в котором для лечения больных холерой использовались фаги с низким титром. Данный метод показал небольшой клинический эффект. В обоих указанных исследованиях авторы применяли коктейли фагов, которые оказались умеренными и произвели слабый терапевтический эффект.

Кроме того, при создании профилактического препарата холерных бактериофагов необходимо учитывать отрицательные эффекты их применения, а именно: возможное инфицирование холерными фагами бактерий

нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека при приеме препарата *per os* [32]. Селекция штаммов производственных фагов дает возможность отобрать вирусные частицы с максимально узким диапазоном специфической литической активности, ограниченной в рамках вида или даже штамма бактерии-хозяина [23]. Следовательно, исключено случайное включение в фаговый препарат штаммов, которые поражают нормальную микрофлору человека. Большой опыт применения моно- и поливалентных фаговых рецептур в терапии и профилактике острых кишечных инфекций, холеры и декомпенсированных форм дисбактериоза в Советском Союзе, России, а также в Польше подтверждает невозможность реализации неспецифической литической фаговой активности в отношении здоровой микрофлоры человека [2, 12, 18].

Однако при применении с профилактической целью препаратов бактериофагов выявлен ряд недостатков. Одним из первых является активизация частицами вирусных иммунных реакций человека [44]. В своих работах польские исследователи показали, что бактериофаги влияют на фагоцитоз и респираторные взрывы фагоцитов, пролиферацию Т-клеток, синтез антител и выработку цитокинов [31]. При этом специфические антитела иммунной системы ликвидируют фаги, в связи с чем следует отбирать менее иммуногенные бактериофаги. Кроме того, при проведении фаготерапии требуется определение соответствующих антител для корректировки штаммового состава препаратов [6, 15]. Ретроспективный анализ отечественной и зарубежной литературы не выявил данных о влиянии холерных фагов на функциональную активность эффекторов врожденного и приобретенного иммунитета, а также о механизмах формирования системного и местного клеточного и гуморального иммунного ответа к холерным фагам у экспериментальных животных. Хотя развитие исследований в таком направлении позволит, на наш взгляд, усовершенствовать профилактику холеры.

Следующий недостаток состоит в модификации фенотипа холерных бактерий за счет внедрения в ДНК хозяина профагового генома [15, 40], вследствие чего появляется модуляция вирулентности бактерии-хозяина. Кроме того, умеренные бактериофаги играют существенную роль в эволюции бактерий, способствуя приобретению возбудителями дополнительных факторов вирулентности. Предотвращение этого процесса напрямую связано с направленной селекцией производственных штаммов, подразумевающей включение в коктейль только литических фагов, не образующих ни при каких условиях устойчивых лизогенов в бактериальной культуре. В связи с этим фаги, применяемые для про-

филактики инфекционных заболеваний, должны быть исключительно вирулентными [18, 37]. Решение данного вопроса непосредственно связано с современными методами изучения штаммов бактериофагов. Использование полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа позволяет подтвердить, что фаг вирулентный, а также исключить наличие генов интегразы, резистентности и токсинов в его геноме, что максимально обезопасит применение бактериофагов [40].

Еще одним недостатком служит возможное попадание в организм человека холерных токсинов бактерии-хозяина, которые содержатся в стерильном фильтрате фагового коктейля. Однако качественная фильтрация фаголизата существенно решает эту проблему [15, 21, 30, 46].

Таким образом, для применения бактериофагов с профилактической целью при холере необходимо совершенствование технологического процесса получения холерных фаголизатов с высоким титром вирусных частиц и введение этапов специфической очистки от холерного токсина. С помощью молекулярно-генетических методов следует подтверждать вирулентную природу используемых бактериофагов, отсутствие генов патогенности в фаговых геномах, что позволит обеспечить высокий уровень безопасности и эффективности противохолерных фаговых препаратов. Многочисленные исследования, проведенные *in vivo* и *in vitro*, подтвердили безопасность и эффективность холерных бактериофагов при профилактике холеры.

Однако нужны дополнительные исследования для правильного понимания уникальных фармакологических свойств холерных фагов, которые существенно влияют на их использование с профилактической целью. Точно так же, как и иммуномодулирующие функции, потенциал устойчивости и его роль в сохранении резистентности к антибиотикам требуют более подробного изучения.

## Литература

1. Акимкин В.Г., Дарбева О.С., Колков В.Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы // Клиническая практика. — 2010. — № 4 — С. 48–54.
2. Алешкин А.В., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Галимзянов Х.М., Рубальский О.В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть 1: История исследований до широкого применения антибиотиков // Научные обзоры. — 2016. — С. 10–13.
3. Алешкин А.В., Воложанцев Н.В., Светоч Э.А. Бактериофаги как пробиотические микроорганизмы: специализированный продукт диетического профилактического питания на основе бактериофагов в профилактике инфекций,

- передающихся пищевым путем // Инфекцион. болезни. — 2016. — Т. 14. — № 2. — С. 31–40.
4. Бактериофаги: биология и практическое применение / Под. ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. Пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. А.В. Летаров. — М.: Научный мир, 2012. — 640 с.
  5. Беспалова И.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А. Современное состояние специфической профилактики холеры // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2018. — Т. 17. — № 1(98). — С. 55–61.
  6. Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Ершова О.Н., Новикова Л.И., Афанасьев С.О., Киселева И.А., Зулькарнеев Э.Р., Рубальский Е.О., Борисова О.Ю., Караулов А.В. Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2017. — № 4. — С. 42–48.
  7. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Качкина Г.В., Алиева А.А., Саямов С.Р. Отбор бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, вызванной классическими холерными вибрионами // Современные наукоемкие технологии. — 2004. — № 3. — С. 11–15.
  8. Горяев А.А., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры // БИО препараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2018. — Вып. 18(1). — С. 42–49.
  9. Давидович Н.В., Соловьева Н.В., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А. Эндоекологические аспекты устойчивости к антибиотикам: обзор литературы // Экология человека. — 2020. — № 5. — С. 31–36.
  10. Захаренко С.М. Бактериофаги: Современные аспекты применения, перспективы на будущее // Медицинский совет. — 2013. — № 10. — С. 72–74.
  11. Зоркин С.Н., Шахновский Д.С. Возможности бактериофаготерапии при лечении больных с осложненной инфекцией мочевых путей // Педиатрическая фармакология. — 2013. — Т. 10. — № 4. — С. 132–138.
  12. Зуева Л.П., Асланов Б.И., Акимкин В.Г. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2014. — № 3. — С. 100–107.
  13. Ильина Т.С., Толордава Э.Р., Романова Ю.М. Взгляд на фаготерапию через 100 лет после открытия бактериофагов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2019. — Вып. 37(3). — С. 103–112.
  14. Киселева И.А. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: пути повышения эффективности / Материалы II Нац. конгр. бактериологов. Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6. — № 3. — С. 43–44.
  15. Киселева И.А. Специализированный продукт диетического профилактического питания на основе коктейля бактериофагов: конструирование, технология производства, оценка безопасности и эффективности применения: дис. канд. биол. наук. — М., 2015.
  16. Коломиец Э.И., Романовская Т.В., Сверчкова Н.В. Перспективы использования бактериофагов в составе моющих средств с пробиотическим действием / Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. — 2020. — Том 12. — С. 373–388.
  17. Красильников И.В., Лобастова А.К., Лыско К.А. Некоторые аспекты современного состояния и перспективных направлений развития производства и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов // Биопрепараты. — 2010. — № 2 (38). — С. 28–33.
  18. Лыско К.А., Отрашевская Е.В., Игнатьев Г.М. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: краткий обзор производства и применения // Биопрепараты. — 2013. — № 4. — С. 4–9.
  19. Маркин Ю., Редько С., Клёнкина Е. Путь к здоровью без антибиотиков // Животноводство России. — 2020 сентябрь. — С. 52–54.
  20. Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.-X., Ramamurthy T. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 3. — С. 17–26.
  21. Монахова Е.В., Писанов Р.В. Токсины холерных вибрионов // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. — 2005. — № 1. — С. 7–18.
  22. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Куриленко М.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Мишанькин Б.М., Кривенко А.С., Анисимова Г.Б., Носков А.К. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 2. — С. 38–47.
  23. Мустафин А.Х. Биотехнологические параметры разработки фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *Vacillus subtilis* в пищевом сырье и продуктах питания: дис. канд. биол. наук. — Ульяновск (защита в Саратове, 2012). — 147 с.
  24. Мухин Е.Б. Разработка препарата на основе бактериофагов. // Знания молодых для развития ветеринар. медицины и АПК страны. — 2015. — С. 14–148.
  25. 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. — № 70(2). — С. 249–256.
  26. Спрей для рук с бактериофагами и пребиотиками [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://www.shop.rospromzdrav.ru/product\\_info.php?cPath=41\\_46&products\\_id=7](https://www.shop.rospromzdrav.ru/product_info.php?cPath=41_46&products_id=7). — Дата доступа: 18.03.2021.
  27. Устойчивость к противомикробным препаратам / Сайт Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). URL:



- <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (дата обращения: 27.10.2019).
28. *Abedon T.S.* Phage treatment of human infections // *Bacteriophage*. — 2017. — Vol. 1. — No. 2. — P. 66–85.
  29. *Bhandare S., Colom J., Baig A., Ritchie, Bukhari H.* Reviving phage therapy for the treatment of cholera // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2019. — Vol. 219(5). — P. 786–794.
  30. *Boratynski J., Syper L., Weber-Dabrowska B.* Preparation of endotoxin-free bacteriophages // *Cellular & Molecular Biology Letters*. — 2004. — Vol. 9. — P. 253–259.
  31. *Borysowski J., Dabrowska K., Ohams M.* The response of the immune system to phage: potential associations with phage therapy / Conference: «Bacteriophages and Probiotics – Alternatives to Antibiotics» dedicated to the 120<sup>th</sup> birth anniversary of Professor George Eliava. Abstract book. — Tbilisi, Georgia, 2012. — P. 33.
  32. *Brussow H.* Phages of dairy bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2001. — Vol. 55. — P. 283–284.
  33. *Chanishvili N.* Phage therapy — history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches // *Adv. Virus. Res.* — 2012. — Vol. 83. — P. 3–40.
  34. *Czaplewski L., Clokie M., Bax R.* Alternatives to antibiotics — a pipeline portfolio review // *Lancet. Infect. Dis.* — 2016. — Vol. 16(2). — P. 239–251.
  35. *Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T.* Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms // *Vaccine*. — 2020. — Vol. 1. — P. 83–92.
  36. *De S.N., Chatterje D.N.* An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane // *J. Pathol. Bacteriol.* — 1953. — Vol. 66(2). — P. 59–62. doi: 10.1002/path.1700660228.
  37. *Goodridge D.L., Bisha B.* Phage based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods // *Bacteriophage*. — 2011. — Vol. 1(3). — P. 130–137.
  38. *Jaiswal A., Koley H., Mitra S., Saha D.R., Sarkar B.* Comparative analysis of different oral approaches to treat *Vibrio cholerae* infection in adult mice // *Int. J. Med. Microbiol.* — 2014. — Vol. 304(3–4). — P. 422–430.
  39. *Kitaoka M., Miyata S.T., Unterweger D., Pukatzki S.* Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholera* // *J. Med. Microbiol.* — 2011. — Vol. 60. — P. 397–407.
  40. *Letarov A., Golomidova A.K., Tarasyan K.K.* Ecological basis of rational phage therapy // *Acta Naturae*. — 2010. — № 2. — P. 60–71.
  41. *Malik D.J., Sokolov I.J., Vinner G.K., et al.* Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy // *Adv. Colloid Interface Sci.* — 2017. — Vol. 249. — P. 100–133.
  42. *Marcuk L.M., Nikiiforov V.N., Scerbak J.F., et al.* Clinical studies of the use of bacteriophage in the treatment of cholera // *Bull World Health Organ*. — 1971. — Vol. 45. — P. 77–83.
  43. *Monsur K.A., Rahman M.A., Huq F., Islam M.N., Northrup R.S., Hirschhorn N.* Effect of massive doses of bacteriophage on excretion of vibrios, duration of diarrhoea and output of stools in acute cases of cholera // *Bull. World Health Organ*. — 1970. — Vol. 42. — P. 23–32.
  44. *Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G.* Bacteriophage therapy // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2001. — Vol. 45(3). — P. 49–59.
  45. *Sulakvelidze A.* The challenges of bacteriophage therapy // *Indust. Pharmacy*. — 2011. — Vol. 45(31). — P. 14–18.
  46. *Wahida A., Ritter K., Horz H.-P.* The Janus-Face of bacteriophages across human body habitats // *PLoS Pathog.* — 2016. — Vol. 12(6): e1005634. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005634>.
  47. *Wei Y., Ocampo P., Levin B.R.* An experimental study of the population and evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 and the bacteriophage JSF4 // *Proc. Biol. Sci.* — 2010. — Vol. 277(1698). — P. 3247–3254.
  48. *Wong K.K., Burdette E., Mahon B.E., Mintz E.D., Ryan E.T., Reingold A.L.* Recommendations of the advisory committee on immunization practices for use of cholera vaccine // *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* — 2017. — Vol. 66(18). — P. 482–485.
  49. *Yen M., Cairns L.S., Camilli A.* A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models // *Nat. Commun.* — 2017. — Vol. 1. — No. 8. — P. 14187.

## References

1. Akimkin VG Darbeyeva OS, Kolkov VF. Bakteriofagi: istoricheskiye i sovremennyye aspekty ikh primeneniya: opyt i perspektivy. *Klinicheskaya praktika* 2010; 4:48–54 (in Russian).
2. Aleshkin AV, Aleshkin VA, Afanas'yev SS, Galimzyanov KHM, Rubal'skiy OV. Bakteriofagi v infektsionnoy patologii. Chast' 1: Istoriya issledovaniy do shirokogo primeneniya antibiotikov. *Nauchnyye obzory* 2016; 10–13 (in Russian).
3. Aleshkin AV, Volozhantsev NV, Svetoch EA. Bakteriofagi kak probioticheskiye mikroorganizmy: spetsializirovanny produkt diyeticheskogo profilakticheskogo pitaniya na osnove bakteriofagov v profilaktike infektsiy, peredayushchikhsya pishchevym putem. *Infektsion bolezni* 2016; 14(2):31–40 (in Russian).
4. Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoye primeneniye / Pod red E Katter, A Sulakvelidze. Per s angl kollektiv perevodchikov; nauch red AV Letarov. Moscow: Nauchnyy mir, 2012: 640 (in Russian).
5. Bespalova IA, Ivanova IA, Omel'chenko ND, Filippenko AV, Trufanova AA. Sovremennoye sostoyaniye spetsificheskoy profilaktiki kholery. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika* 2018; 17(1):55–61 (in Russian).
6. Bochkareva SS, Aleshkin AV, Yershova ON, Novikova LI, Afanas'yev SO, Kiseleva IA, Zul'karneyev ER, Rubal'skiy YeO, Borisova OYu, Karaulov AV. Immunologicheskiye aspekty fagoterapii infektsiy, svyazannykh s okazaniyem medita-

- sinskoy pomoshchi, v otdelenii neyroreanimatsii. Zhurn. mikrobiol., epidemiol., immunobiol 2017; 4:42–48 (in Russian).
7. Gayevskaya NYe, Kudryakova TA, Kachkina GV, Aliyeva AA, Sayamov SR. Otkhod bakteriofagov dlya lecheniya eksperimental'noy kholery, vyzvannoy klassicheskimi kholernymi vibriionami. Sovremennyye naukoymkiye tekhnologii 2004; 3:11–15 (in Russian).
  8. Goryayev AA, Sayapina LV, Obukhov YUI, Bondarev VP. Effektivnost' i bezopasnost' vaktsin dlya profilaktiki kholery. BIO preparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye 2018; 18(1):42–49 (in Russian).
  9. Davidovich NV, Solov'yeva NV, Bashilova YeN, Bazhukova TA. Endoekologicheskiye aspekty ustoychivosti k antibiotikam: obzor literatury. Ekologiya cheloveka 2020(5):31–36 (in Russian).
  10. Zakharenko SM. Bakteriofagi: Sovremennyye aspekty primeneniya, perspektivy na budushcheye. Meditsinskiy sovet 2013; 10:72–74 (in Russian).
  11. Zorkin SN, Shakhnovskiy DS. Vozmozhnosti bakteriofagoterapii pri lechenii bol'nykh s oslozhnennoy infektsiyey mochevykh putey. Pediatricheskaya farmakologiya 2013; 10(4):132–138 (in Russian).
  12. Zuyeva LP, Aslanov BI, Akimkin VG. Sovremennyy vzglyad na rol' bakteriofagov v evolyutsii gospital'nykh shtammov i profilaktike infektsiy, svyazannykh s okazaniyem meditsinskoy pomoshchi. Zhurn mikrobiol, epidemiol, immunobiol 2014; 3:100–107 (in Russian).
  13. Il'ina TS, Tolordava ER, Romanova YuM. Vzglyad na fagoterapiyu cherez 100 let posle otkrytiya bakteriofagov. Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya 2019; 37(3):103–112 (in Russian).
  14. Kiseleva IA. Bakteriofagi v profilaktike infektsiy, svyazannykh s okazaniyem meditsinskoy pomoshchi: puti povysheniya effektivnosti. Materialy II Nats kong bakteriologov. Infektsiya i immunitet 2016; 6(3):43–44 (in Russian).
  15. Kiseleva IA. Spetsializirovanny produkt diyeticheskogo profilakticheskogo pitaniya na osnove kokteylya bakteriofagov: konstruirovaniye, tekhnologiya proizvodstva, otsenka bezopasnosti i effektivnosti primeneniya: dis kand biol nauk. Moscow, 2015 (in Russian).
  16. Kolomiyets EI, Romanovskaya TV, Sverchkova NV. Perspektivy ispol'zovaniya bakteriofagov v sostave moyushchikh sredstv s probioticheskim deystviyem. Mikrobnyye biotekhnologii: fundamental'nyye i prikladnyye aspekty 2020; 12:373–388 (in Russian).
  17. Krasil'nikov IV, Lobastova AK, Lysko KA. Nekotoryye aspekty sovremennoy sostoyaniya i perspektivnykh napravleniy razvitiya proizvodstva i primeneniya lechenoprofilakticheskikh preparatov bakteriofagov. Biopreparaty 2010; 2(38):28–33 (in Russian).
  18. Lysko KA, Otrashnevskaya YeV, Ignat'yev GM. Lechenoprofilakticheskiye preparaty bakteriofagov: kratkiy obzor proizvodstva i primeneniya. Biopreparaty 2013; 4:4–9 (in Russian).
  19. Markin YU, Red'ko S, Klonkina Ye. Put' k zdorov'yu bez antibiotikov. Zhivotnovodstvo Rossii 2020; sentyabr': 52–54 (in Russian).
  20. Monakhova YeV, Ghosh A, Mutreja A, Weill F-X, Ramamurthy T. Endemichnaya kholera v Indii i zavoznaya kholera v Rossii: chto obshchego? Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 3:17–26 (in Russian).
  21. Monakhova YeV, Pisanov RV. Toksiny kholernykh vibriionov. Molekulyarnaya genetika mikrobiologiya i virusologiya 2005; 1:7–18 (in Russian).
  22. Moskvitina EA, Yanovich YeG, Kurilenko ML, Kruglikov VD, Titova SV, Levchenko DA, Vodop'yanov AS, Lopatin AA, Ivanova SM, Mishan'kin BM, Krivenko AS, Anisimova GB, Noskov AK. Kholera: monitoring epidemiologicheskoy obstanovki v mire i Rossii (2010–2019 gg). Prognoz na 2020 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 2:38–47 (in Russian).
  23. Mustafin AKh. Biotekhnologicheskiye parametry razrabotki fagovogo preparata dlya indikatsii i identifikatsii bakteriy Bacillus subtilis v pishchevom syr'ye i produktakh pitaniya: dis kand biol nauk. Ul'yanovsk (zashchita v Saratove, 2012): 147 (in Russian).
  24. Mukhin YeB. Razrabotka preparata na osnove bakteriofagov.. Znaniya molodykh dlya razvitiya veterinar. meditsiny i APK strany 2015: 14–148 (in Russian).
  25. Onishchenko GG, Moskvitina EA, Kruglikov VD, Titova SV, Adamenko OL, Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO. Epidemiologicheskiy nadzor za kholeroy v Rossii v period sed'moy pandemii. Vestnik RAMN 2015; 70(2):249–256 (in Russian).
  26. Sprey dlya ruk s bakteriofagami i prebiotikami [Elektronnyy resurs]. URL: [https://www.shop.rospromzdrav.ru/product\\_info.php?cPath=41\\_46&products\\_id=7](https://www.shop.rospromzdrav.ru/product_info.php?cPath=41_46&products_id=7). Data dostupa: 18.03.2021 (in Russian).
  27. Ustoychivost' k protivomikrobnym preparatam. Sayt Vsemirnogo organizatsii zdravookhraneniya (VOZ). URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (data obrashcheniya: 27.10.2019) (in Russian).
  28. Abedon TS. Phage treatment of human infections. Bacteriophage 2017; 1(2):66–85.
  29. Bhandare S, Colom J, Baig A, Ritchie, Bukhari H. Reviving phage therapy for the treatment of cholera. The Journal of Infectious Diseases 2019; 219(5):786–794.
  30. Boratynski J., Syper L., Weber-Dabrowska B. Preparation of endotoxin-free bacteriophages. Cellular & Molecular Biology Letters 2004; 9:253–259.
  31. Borysowski J, Dabrowska K, Ohams M. The response of the immune system to phage: potential associations with phage therapy. Conference: «Bacteriophages and Probiotics – Alternatives to Antibiotics» dedicated to the 120<sup>th</sup> birth anniversary of Professor George Eliava. Abstract book. Tbilisi, Georgia, 2012: 33.
  32. Brussow H. Phages of dairy bacteria. Annu Rev Microbiol 2001; 55:283–284.

33. Chanishvili N. Phage therapy – history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res* 2012; 83:3–40.
34. Czaplewski L, Clokie M, Bax R. Alternatives to antibiotics – a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis* 2016; 16(2):239–251.
35. Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine* 2020; 1:83–92.
36. De SN, Chatterje DN. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J Pathol Bacteriol* 1953; 66(2):59–62. doi: 10.1002/path.1700660228.
37. Goodridge DL, Bisha B. Phage based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage* 2011; 1(3):130–137.
38. Jaiswal A, Koley H, Mitra S, Saha DR, Sarkar B. Comparative analysis of different oral approaches to treat *Vibrio cholerae* infection in adult mice. *Int J Med Microbiol* 2014; 304(3–4):422–430.
39. Kitaoka M, Miyata ST, Unterweger D, Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholera*. *J Med Microbiol* 2011; 60:397–407.
40. Letarov A, Golomidova AK, Tarasyan KK. Ecological basis of rational phage therapy. *Acta Naturae* 2010(2):60–71.
41. Malik DJ, Sokolov IJ, Vinner GK, et al. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci* 2017; 249:100–133.
42. Marcuk LM, Nikiforov VN, Scerbak JF, et al. Clinical studies of the use of bacteriophage in the treatment of cholera. *Bull World Health Organ* 1971; 45:77–83.
43. Monsur KA, Rahman MA, Huq F, Islam MN, Northrup RS, Hirschhorn N. Effect of massive doses of bacteriophage on excretion of vibrios, duration of diarrhoea and output of stools in acute cases of cholera. *Bull World Health Organ* 1970; 42:23–32.
44. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3):49–59.
45. Sulakvelidze A. The challenges of bacteriophage therapy. *Indust Pharmacy* 2011; 45(31):14–18.
46. Wahida A, Ritter K, Horz H-P. The Janus-Face of bacteriophages across human body habitats. *PLoS Pathog* 2016; 12(6):e1005634. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005634>.
47. Wei Y, Ocampo P, Levin BR. An experimental study of the population and evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 and the bacteriophage JSF4. *Proc Biol Sci* 2010; 277(1698):3247–3254.
48. Wong KK, Burdette E, Mahon BE, Mintz ED, Ryan ET, Reingold AL. Recommendations of the advisory committee on immunization practices for use of cholera vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 66(18):482–485.
49. Yen M, Cairns LS, Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. *Nat Commun* 2017; 1(8):14187.

## DESIGN ASPECTS OF THE EXPERIMENTAL PREVENTIVE PREPARATIONS BASED ON CHOLERA BACTERIOPHAGES

A.V. TYURINA, N.E. GAEVSKAYA, M.P. POGOZHOVA, A.O. ANOPRIENKO

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

The review considers the issue of creating experimental prophylactic drugs based on cholera bacteriophages. Analysis of the state of the problem testifies in favor of the need to search for new possibilities for phage prophylaxis of cholera. When creating new prophylactic cholera drugs, one should take into account their positive and negative results on their use for prophylactic purposes. Based on the analysis, it was concluded that for the use of bacteriophages for the prevention of cholera, it is necessary to improve the technological process for obtaining cholera phagolysates with a high titer of viral particles and to introduce stages of specific purification from cholera toxin. With the help of molecular genetic methods, it is necessary to confirm the virulent nature of the bacteriophages used, the absence of pathogenicity genes in phage genomes, which will ensure a high level of safety and efficacy of cholera phage drugs. Numerous studies carried out *in vivo* and *in vitro* have confirmed the safety and efficacy of cholera bacteriophages in the prevention of cholera.

**Keywords:** cholera bacteriophages, construction, prevention of cholera.

### **Address:**

Tyurina A.V.

Junior Researcher, Laboratory of Bacteriophages.

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

E-mail: tyurina.anuta2010@yandex.ru

**Для цитирования:**

Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Анопrienко А.О. Аспекты конструирования экспериментальных профилактических препаратов на основе холерных бактериофагов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(3):60–68.

**For citation:**

Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O. Design aspects of the experimental preventive preparations based on cholera bacteriophages. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(3):60–68 (in Russian).

## МОДЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ ИЗУЧЕНИИ СВОЙСТВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

О.Ф. КРЕТЕНЧУК\*, В.А. КОРШЕНКО, И.А. ЩИПЕЛЕВА

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

В обзоре представлены данные о различных моделях перевиваемых клеточных линий, которые применяют как альтернативу биологическим объектам для получения новых сведений о холерных вибрионах. Проанализированы литературные источники из баз данных электронных библиотек e-library, PubMed, КиберЛенинка и др. Показаны возможности и перспективы исследований с использованием клеточных технологий.

*Ключевые слова:* клеточные линии, холера, *Vibrio cholerae*, токсин, адгезия, холерная вакцина.

### Введение

Клеточные технологии являются одним из наиболее перспективных направлений развития медицины и биологии. Несмотря на то, что эксперименты с использованием лабораторных животных — неотъемлемая часть медико-биологических исследований [33, 49], целесообразным является сокращение их повсеместного использования и соблюдение определенных нравственных норм. Для полной или частичной замены классических биологических моделей на альтернативные необходимо всегда проводить оценку доступных методов *in vitro* и *ex vivo*, удовлетворяющую требованиям биоэтики [24].

Одним из таких альтернативных методов является применение перевиваемых клеточных линий. Данные методы высокочувствительны и воспроизводимы, так как в работе используются стандартные среды и референтные клеточные линии [36]. Поддержание исходных клеточных свойств и контроль их состояния осуществляют Национальные коллекции разных стран, создание которых происходило, в основном, во второй половине XX века [28]. В нашей стране Коллекция клеточных культур (РККК) была создана в 1978 году по инициативе д.б.н., профессора, заслуженного деятеля науки РФ Георгия Петровича Пинаева (1929–2013) [29]. В состав РККК входят 9 специализированных коллекций. Основными

задачами РККК являются не только сбор клеточных линий, хранение клеточного материала (криоконсервация), паспортизация (характеристика клеточных линий, контроль качества), депонирование клеточных линий в связи с патентованием, создание информационного банка данных по клеточным культурам, но и распространение образцов коллекционных клеточных линий среди разных учреждений РФ и стран СНГ, научно-методическая помощь по методам культивирования и анализа клеточных культур. Основную информацию о свойствах клеточных линий можно получить в электронном каталоге «Российская коллекция клеточных культур позвоночных» [9].

### Модели клеточных линий при исследовании холерных эмбрионов

Цель настоящего обзора — анализ данных литературных источников по различным аспектам применения перевиваемых клеточных линий для изучения свойств холерных вибрионов.

Несмотря на стремление к повсеместному внедрению норм санитарии и гигиены в мире, улучшению положения с качеством питьевой воды и совершенствованию методов лечения эпидемиологическая ситуация по холере в мире оценивается как нестабильная [23]. Ежегодно от холеры, по оценкам ВОЗ, умирают около 100000 человек. Учитывая риски продолжения эпидемических проявлений холеры в эндемичных странах, межконтинентальные, межгосударственные и трансграничные завозы, не исключаются завозы инфекции в другие страны, в том числе и в субъекты РФ [25].

На сегодняшний день накоплено много сведений, касающихся эпидемиологии, микробиологии, диагно-

© 2021 г. Кретенчук О.Ф., Коршенко В.А., Щипелева И.А.

\* **Автор для переписки:**

Кретенчук Оксана Федоровна

канд. биол. наук, ст. научный сотрудник научного отдела, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
E-mail: oksidjinf@mail.ru

стики и профилактики возбудителя холеры, однако до сих пор многие вопросы остаются нерешенными. Исследования на культуре клеток, позволяющие заменить или сократить использование лабораторных животных, помогут внести вклад не только в изучение биологических свойств *Vibrio cholerae*, но и в разработку новых диагностических, вакцинных и лекарственных препаратов.

Метод культуры клеток в изучении холерных вибрионов большой популярностью стал пользоваться с 1980–1990-х годов. Спектр клеточных линий, имеющих в распоряжении исследователей в настоящее время, довольно широк. В данном обзоре рассмотрим экспериментальные разработки, представляющие, на наш взгляд, наибольший интерес.

Преобладающее количество публикаций посвящено изучению взаимодействия токсических субстанций, продуцируемых вибрионами, с клеткой в тестах *in vitro*. Предложены индикаторные клеточные линии, по изменению морфологии которых не только диагностируют токсины, но и оценивают их активность. Одним из основных факторов вирулентности (и эпидемической значимости) холерных вибрионов, определяющих тяжесть клинической картины при холере, является холерный токсин (ХТ) [13]. В лабораторной практике для оценки эпидемической значимости штаммов *Vibrio cholerae* широко применяют молекулярно-генетические методы, в частности, полимеразную цепную реакцию, которая позволяет за 3–4 часа проанализировать значительное число проб. Также проводят определение гемолитической активности по Грейгу, чувствительности к холерным фактам  $stx^+$  и  $stx^-$ , токсигенности на кроликах-сосунках [14]. Однако ввиду нестандартности любых биологических моделей, обусловленной индивидуальной реакцией различных животных, исследователи все чаще делают выбор в пользу перевиваемых клеточных линий. Механизм действия ХТ на клетки эпителия тонкой кишки известен [47], но его влияние на межклеточную проницаемость, на уровень белков плотных контактов остается неизученным [4]. В работе с ХТ используют овариальные клетки китайского хомячка СНО-К1, эпителиальные клетки почки африканской зеленой мартышки Vero и Y-1. Наиболее перспективно для замены биомоделей использование СНО-К1 (стандартная модель для изучения токсичности веществ). Суть метода заключается в том, что молекулы ХТ вызывают морфологические изменения клеток (удлинение, деформация, появление разветвленных отростков клеток), которые сопутствуют изменениям биохимических процессов в клетке и регистрируются визуально с помощью микроскопа [2, 18].

Модельная система клеточной культуры СНО-К1 дает возможность проводить оценку биологической активности различных форм холерного токсина. Известно, что часть ХТ связана с везикулами наружной мембраны (20–200 нм), высвобождаемыми *V. cholerae*. Несмотря на большое количество опубликованных данных об активности растворимой формы ХТ, ничего не было известно о связанной с везикулами форме и ее взаимодействии с клеткой-хозяином. Чтобы выяснить это, зарубежные исследователи [43] использовали хорошо зарекомендовавшую себя линию клеток СНО-К1. Проведенный анализ показал, что ассоциированный с везикулами холерный токсин физиологически активен. В свою очередь, меченные флуоресцентным красителем везикулы взаимодействовали с эпителиальными клетками кишечника Int-407 и интернализировались, повышая уровень цАМФ (индикатор токсичности ХТ), который можно было уменьшить преинкубацией с GM1 (рецептор ХТ). Эти результаты согласуются с моделью, в которой взаимодействие ХТ/GM1 напрямую запускает эндоцитоз везикул [46], обеспечивая защитную среду для передачи факторов вирулентности от бактерий в клетки-мишени.

Отечественные ученые предложили использовать богатую ганглиозидами СНО-К1 в качестве твердой фазы для обнаружения токсин-продуцирующих штаммов холерных вибрионов одновременно с иммуоферментным анализом (ИФА) [30]. Надежного прикрепления клеток к пластику достигали путем их фиксации глутаральдегидом, что не отражалось на реакции связывания токсинов с мембранными рецепторами эукариот и обеспечивало хранение панели в холодильнике в течение месяца. Данная методика позволяет не только выявлять наибольшее число токсинопродуцентов *V. cholerae*, но и определять иммунохимическую и биологическую активность препаратов холерогена различной степени чистоты [18]. При постановке СНО–ИФА необходимо учитывать факт завышения титра холерного токсина, если в исследуемых супернатантах (надосадочные жидкости штаммов *V. cholerae*) содержатся нейраминидаза (завышение в 4 раза) или протеаза (в 16 раз), и факт маскировки эффекта удлинения клеток при наличии в них гемолизина, дермонекротического фактора, эндотоксина в тех титрах, в которых они вызывают деструкцию (2,5 мкг/мл, 16,7 мкг/мл, 166,7 мкг/мл соответственно) [1]. По чувствительности СНО–ИФА (1 мкг/мл) уступает другим вариантам ИФА, однако может быть рекомендован наряду с другими методами для характеристики структуры токсина и изучения его взаимодействия с тканевым рецептором GM1.

Известно, что население эндемичных по холере стран использует для лечения холеры растительные препараты, в том числе высокоочищенные [3]. Применение культуры клеток СНО-К1 открывает новые перспективы для изучения веществ, обладающих ингибирующим эффектом в отношении холерного токсина. В целях поиска таких препаратов на модели СНО-К1 определяли биологическую активность ХТ, инкубированного с водными экстрактами растений. Учет реакции проводили путем сравнения морфологии опытных и контрольных клеток СНО-К1 с помощью инвертированного микроскопа. Принимая во внимание тот факт, что растения являются источником различных биологически активных соединений, авторы сначала провели оценку их токсичности: гибель СНО-К1 происходила в присутствии клена (токсичный); округление СНО-К1 вызывали в низких разведениях экстракты из листьев дуба, зверобоя, хмеля, базилика; наименее токсичными оказались чистотел, тысячелистник, хмель, базилик и ревень. На следующем этапе был протестирован ХТ, инкубированный с экстрактами растений. Применение культуры клеток позволило оценить биологическую активность токсина, которая зависит от его А-субъединицы, а для определения эффективности взаимодействия рецептора GM1 с В-субъединицей ХТ авторы использовали ИФА. В результате было показано, что экстракты ореха, зверобоя, тысячелистника, базилика не влияют на активность ХТ *V. cholerae* O1 в ИФА и культуре клеток СНО-К1, а экстракты чистотела и ревеня, не снижая иммунохимической активности ХТ, препятствуют удлинению клеток СНО-К1. Экстракты дуба и хмеля подавляют связывание в ИФА холерного токсина с рецепторами GM1, незначительно снижая его активность в культуре клеток [15]. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения экстрактов растений с применением перевиваемых клеточных линий, поскольку механизмы их действия разнообразны. Подобные исследования проведены не только в отношении холерного токсина, но и гемолизина, который был нейтрализован в течение 10 минут при совместной инкубации с экстрактами растений *Rhei* (ревень), *Limonium gmelinii* (кермек Гмелина) и *Quercus robur* (дуб черешчатый) [16]. Таким образом, лекарственные растения не утратили своего значения и в наши дни, а использование перевиваемых клеточных линий позволит получить новые сведения об их эффективности.

Одним из действенных способов предупреждения и ликвидации эпидемий является применение оральных холерных вакцин [7]. В связи с этим российские ученые

провели работу по внедрению метода клеточных культур для определения специфической активности холерного токсина и компонента вакцины холерогена-анатоксина в производство холерной химической бивалентной вакцины, что впоследствии позволит существенно сократить использование животных на всех этапах [8]. Полученные результаты на модели СНО-К1, тестируемой в соответствии с промышленным регламентом, коррелируют с данными по активности ХТ, определяемой внутрикожной пробой по Крейгу и иммунохимическим методом РПИГ (реакция пассивного иммунного гемолиза): низкая специфичность по Крейгу (1:2000) и РПИГ (1:8) подтверждается на модели клеток СНО-К1 (1:160); высокая активность холерного токсина по методу Крейга (1:128000), РПИГ (1:128) — на модели клеток СНО-К1 (1:1280) [5].

Таким образом, данные литературы свидетельствуют, что наиболее чувствительной линией в отношении ХТ является культура СНО-К1 [6], позволяющая выявлять до 20–30 пг/мл токсина. В то же время наиболее приближенной к условиям *in vivo* моделью является культура эпителиальных клеток тонкой кишки человека Сасо-2, образующая монослой, подобные нормальному эпителию кишечника [39]. Она представляет собой иммортализованную клеточную линию, полученную из колоректальной карциномы человека. Данная модель нашла широкое применение при изучении и понимании: механизма связывания субъединицы В холерного токсина с клетками кишечника [48]; особенностей трансцитоза *V. cholerae* [39]; врожденного иммунного ответа на инфекцию [40]; действия токсинов в присутствии *Lactobacillus acidophilus*, ослабляющих их выработку [37], и других. Зарубежные исследователи на модели клеток Сасо-2 показали ингибирующее действие Zn, Se и Mn на адгезию *V. cholerae* [38]. Кроме того, минералы были эффективны в подавлении выработки холерного токсина и снижали его общую концентрацию более чем на 95% в трех изолятах *V. cholerae*. Однако Zn, Se и Mn не влияли на связывание холерного токсина с рецептором GM1 на эпителиальных клетках кишечника, то есть ингибирующее действие осуществляли, в первую очередь, через механизм вирулентности бактерии. Подобные работы с использованием модели клеточных культур открывают новые перспективы в альтернативных стратегиях борьбы с холерой.

Несмотря на то, что в патогенезе холеры центральное место принадлежит холерному токсину, патогенность *V. cholerae* носит выраженный полидетерминантный характер [22, 50]. Исследования с привлечением куль-

туры клеток будут способствовать получению новых знаний о токсинах, количество которых с каждым годом увеличивается, и их роли в патогенезе. На сегодняшний день обнаружен целый ряд токсических субстанций [19], генетические детерминанты большинства из которых представлены в базах GenBank: токсины Zot (*zonula occludens toxin*) и Ace (*accessory cholera enterotoxin*), гены которых входят вместе с генами холерного токсина *ctxAB* в состав генома умеренных филаментозных фагов СТХφ [53] и pre-СТХφ [41]; MARTX (*multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin*) [52]; гемагглютинин/протеаза (HA/P) [32]; цитотонический фактор Cef (CHO cell elongating factor) [20]; термостабильный токсин (ST) [42]; растворимый гемолизин/цитотоксин HlyA [54] и другие. Уже установлены наиболее адекватные клеточные модели для тестирования: клетки аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2, эпителиальные клетки синовиальной жидкости McCoу и фибробласты мышей L-929 — для Zot [27]; L-929 и CHO-K1 (удлинение клеток) — для Cef [21]; CHO-K1, L-929, клетки карциномы шейки матки HeLa и гортани Her2, эпителиальные клетки почки собаки MDCK (округление клеток) — для гемагглютинин/протеазы [17]. По данным некоторых исследователей [32], наиболее выраженные структурные изменения под действием HA/P происходят в клетках HeLa и L-929, не образующих компактный монослой с плотными контактами между клетками: образование многочисленных пузырьков на поверхности клетки и клазматоз, вакуолизация цитоплазмы, набухание митохондрий, очищение их матрикса и искажения крист, увеличение количества лизосом. В культуре MDCK преобладала вакуолизация цитоплазмы и клазматоз был менее выраженным; в Caco-2 — расширение межклеточного пространства без нарушения плотных контактов, набухание митохондрий, вакуолизация цитоплазмы и клазматоз на апикальной поверхности [32]. Однако вопросы, касающиеся структуры, функций и механизма действия токсических субстанций, изучены недостаточно, что обосновывает применение перевиваемых клеточных линий.

Культуру клеток можно использовать в качестве модели для изучения адгезии холерных вибрионов. Ранее исследователи предлагали различные способы определения уровня адгезии вибрионов с использованием эритроцитов [31, 35], эпителия кишечника кролика [10]. Данные методы не только трудоемки, не удовлетворяют требованиям биоэтики, но и не являются адекватной моделью, поскольку холера — не инвазивная инфекция [12]. В связи с этим был разработан более эффективный способ определения адгезивной активности холерных

вибрионов с использованием перевиваемой монослойной человеческой клеточной линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки NuTu 80 [34]. В результате были установлены различные уровни адгезии: высокие (21,14) — у классических вибрионов; средние (16,34) — у вибрионов Эль Тор; низкие (4,7) — у вибрионов O139 серогруппы. Также авторами был сделан вывод о том, что штаммы  $ctx^-tcp^+$  обладают высоким адгезивным потенциалом, обеспечивающим сохранение популяции холерных вибрионов в кишечнике человека при отсутствии токсинопродукции [11]. Использование NuTu 80 позволяет не только изучать адгезивность бактерий с большей точностью, но и проводить экстраполяцию результатов на организм в целом [34].

Конечно, в обзоре невозможно охватить весь перечень публикаций по использованию культуры клеток при изучении холерных вибрионов, но необходимо отметить, что такие исследования актуальны и продолжаются в настоящее время. Если говорить о результатах за последний год, то это: и изучение роли TcrA в индукции продукции муцина и его регуляторного влияния на молекулы врожденного иммунитета на модели совместного культивирования Caco-2 и мононуклеарных клеток периферической крови (Peripheral Blood Mononuclear cells — PBMC) [44]; и оценка цитотоксической активности наночастиц селена (иммуностимулятор) и налоксона (антагонист опиоидных рецепторов), используемых в качестве нового адъюванта для повышения иммунного ответа против убитых цельноклеточных *V. cholerae* у мышей [51]; и определение цитотоксичности производных новых карбоксилатов пиранохинолинил дигидропиридина в отношении клеток L-929 для дальнейшего использования в качестве потенциальных антибактериальных агентов [45]; и установление защитного эффекта *L. acidophilus* на модели Caco-2, что позволит применять их в качестве дополнительного лечения для снижения выработки токсинов при острой инфекционной диарее, вызванной *V. cholerae* [37], и другие, использующие культуру клеток как модель для разработки лечебно-профилактических препаратов.

## Заключение

Наличие паспортизированных перевиваемых клеточных линий различного происхождения в условиях лаборатории дает возможность проведения широкого спектра исследований [51] благодаря значительному разнообразию возможных экспериментальных моделей. Такая широкая популярность и востребованность данного метода



объясняется его очевидными преимуществами: один тип клеток в популяции; строго контролируемые условия культивирования, которые можно изменять в определенных пределах, позволяющих оценивать воздействие различных факторов (биологически активных веществ, рН, температуры и др.); возможность прижизненного наблюдения за клеточными культурами с помощью микроскопа. Конечно, методы исследования *in vitro* не способны полностью воспроизвести всю сложность структурных и функциональных взаимодействий клеток разных типов в составе ткани и органа, но в состоянии дать достоверную информацию о влиянии того или иного вещества на многоклеточный организм. Представленные в обзоре сведения подтверждают высокий потенциал и научно-практическую ценность метода клеточных культур для осуществления различного рода исследований, в том числе и для лучшего понимания вопросов эпидемиологии, микробиологии, диагностики, лечения и профилактики холеры.

## Литература

1. Алексеева Л.П., Сальникова О.И., Лобанов В.В., Оленичева Л.С., Помухина О.И. Взаимодействие холерного токсина с культурой китайского хомячка (СНО) в присутствии биологически активных веществ холерного вибриона / 2-я Всесоюзная конференция «Бактериальные токсины» (27–30 ноября 1989). — Юрмала, Латвия, 1989. — С. 3.
2. Алексеева Л.П., Якушева О.А., Зюзина В.П., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В. Современные методические приемы очистки холерного токсина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 1. — С. 5–9.
3. Андрусенко И.Т., Бардых И.Д. Лекарственные растения при лечении холеры (обзор литературы) // Здоровье населения и среда обитания. — 2008. — № 5. — С. 21–25.
4. Вишневская О.Н. Проницаемость стенки тощей кишки крысы при воздействии холерного токсина и липополисахарида. Дис. на соискание ученой степени к.б.н. — СПб., 2018. — 109 с.
5. Гаева А.В., Генералов С.В., Дуракова О.С., Громова О.В., Ливанова Л.Ф., Волох О.А. Оценка активности холерного токсина при производстве холерной химической вакцины на модели перевиваемой линии клеток СНО-К1 // Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ: Материалы XIV Межгосударственной научн.-практ. конф., посвящ. 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» / Под ред. докт. мед. наук, проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН, докт. мед. наук, проф. В.В. Кутырева. — Саратов: Амирит, 2018. — С. 99–101.
6. Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Волох О.А. Определение специфической активности компонентов холерной химической вакцины с использованием клеточной культуры // Биотехнология. — 2020. — Т. 36. — № 3. — С. 82–89.
7. Горяев А.А., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2018. — № 1. — С. 42–49.
8. Дуракова О.С., Громова О.В., Гаева А.В., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Клокова О.Д., Волох О.А. Экспериментальное обоснование возможности использования перевиваемой линии клеток СНО-К1 для определения специфической активности компонентов холерной химической вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 4. — С. 113–116.
9. Каталог Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РКККП) / Электронный ресурс. URL: [https://www.incras.ru/wp-content/uploads/2019/06/katalog\\_gccc\\_v\\_2018\\_rus.pdf](https://www.incras.ru/wp-content/uploads/2019/06/katalog_gccc_v_2018_rus.pdf) (Дата обращения: 16.04.2021).
10. Королева Г.В., Король В.В., Смоликова Л.М. и др. Адгезивные свойства вибрионов разных видов и 122 адгезивных препаратов / Холера. Вопр. эпидемиол., микробиол. и лаб. Диагност: Матер. Рос. науч. конф. — Ростов-на-Дону, 1992. — С. 88–89.
11. Коршенко В.А., Черепахина И.Я., Якушева О.А., Алексеева Л.П. Роль антилактоферриновой активности в адгезии холерных вибрионов // Фундаментальные исследования. — 2015. — № 1–5. — С. 967–971.
12. Коршенко В.А. Антилактоферриновая активность холерных вибрионов / Дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора. — Оболенск, 2016. — 144 с.
13. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. академика РАМН, профессора Г.Г. Онищенко, чл.-корр. РАМН, профессора В.В. Кутырева. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», издательство «Шико». — 2009. — С. 62–99.
14. Лабораторная диагностика холеры: МУК 4.2.2218–07. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. — 87 с.
15. Маркина О.В., Алексеева Л.П., Маркин Н.В., Телесманич Н.Р. Влияние экстрактов растений на активность холерного токсина *Vibrio cholerae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2013. — № 1. — С. 9–13.
16. Маркина О.В., Алексеева Л.П., Маркин Н.В. Влияние экстрактов растений на цитотоксическую активность гемолизина *Vibrio cholerae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2013. — № 4. — С. 10–16.
17. Маркина О.В., Монахова Е.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В. Изучение биологического действия гемагглютинин/протеазы холерных вибрионов на модели культур клеток // Проблемы особо опасных инфекций. — 2007. — № 2(94). — С. 58–61.

18. Маркина О.В. Изучение токсинопродуцирующей способности штаммов *Vibrio cholerae* O1 и *Vibrio cholerae* O139 с помощью иммуоферментного анализа и культуры клеток. Дис. на соискание ученой степени к.б.н. — Ставрополь, 2008. — 139 с.
19. Монахова Е.В., Мазрухо А.Б. Токсины холерных вибрионов: пути реализации возбудителем патогенных свойств / Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. — Дониздат, 2012. — С. 101–108.
20. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Мазрухо А.Б., Маркина О.В., Алексеева Л.П. Характеристика холерного вибриона Cef (фактор удлинения клеток СНО): биоинформатический анализ и экспериментальные данные // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2012. — Т. 27. — С. 56–60.
21. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В., Ежова М.И., Иванов С.А. Вариабельность генов сef токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 // Проблемы особо опасных инфекций. — 2017. — № 4. — С. 50–55.
22. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae*. Автореферат на соискание ученой степени д.б.н. — Ростов-на-Дону, 2012. — 46 с.
23. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Куриленко М.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Мишанькин Б.М., Кривенко А.С., Анисимова Г.Б., Носков А.К. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 2. — С. 38–47.
24. Мохов А.А., Мурашев А.Н., Красильщикова М.С., Хохлова О.Н., Семушина С.Г., Рассказова Е.А., Ржевский Д.И., Попов В.С., Яворский А.Н. О необходимости совершенствования законодательства в сфере использования лабораторных животных // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2016. — № 4. — С. 62–67.
25. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Левченко Д.А., Янович Е.Г., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И., Подойницына О.А. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 1. — С. 43–51.
26. Пименова Е.В., Храпова Н.П., Замарина Т.В. Достижения в исследовании вируса денге: модели клеточных линий и возможности их использования // Вестник ВолГМУ. — 2020. — № 1(73). — С. 14–19.
27. Писанов Р.В. Конструирование штамма *Escherichia coli*, экспрессирующего ген *zonula occludens toxin* *Vibrio cholerae*. Автореферат на соискание ученой степени к.б.н. — Ростов-на-Дону, 2004. — 22 с.
28. Полянская Г.Г. Развитие коллекции культур клеток позвоночных, созданной проф. Г.П. Пинаевым // Клеточные культуры. Информационный бюллетень. Выпуск 35. Отв. ред. М.С. Богданова. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2019. — С. 3–24.
29. Российская коллекция клеточных культур / Электронный ресурс. URL: <https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/gossijskaja-kollekcija-kletochnyh-kultur/> (Дата обращения: 16.04.2021).
30. Сальникова О.И., Алексеева Л.П., Смирнова О.В., Мазрухо А.Б. Использование твердофазного СНО–ИФА для тестирования холерного токсина // Биотехнология. — 2000. — № 2. — С. 73–78.
31. Савно С.Г., Урбанович Л.Я., Колесник В.С. Использование эритроцитов для выявления адгезивной способности вибрионов // Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций. — Иркутск, 1984. — Ч. 3. — С. 126–127.
32. Саямов С.Р., Монахова Е.В., Федоренко Г.М., Ткачева Т.И., Маркина О.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В., Бардахчян Е.А. Изменения ультраструктуры в культивируемых клетках под действием гемагглютинин/протеазы холерного вибриона // Вестник экспериментальной биологии и медицины. — 2012. — Т. 152. — С. 456–460.
33. Симонова И.Р., Березняк Е.А., Тришина А.В. Роль экспериментальных биологических моделей в изучении особо опасных инфекций и современные аспекты обеспечения биологической безопасности // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16. — № 3. — С. 52–59.
34. Татаренко О.А., Коршенико В.А., Алексеева Л.П., Черпахина И.Я. Способ оценки адгезивных свойств холерных вибрионов *Vibrio cholerae* El Tor и *Vibrio cholerae* O139 на клеточной культуре NuTu-80. Патент № 2595423 РФ; заявл. 09.12.2014; опубл. 27.08.2016.
35. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Колякина А.В. Способ выявления эпидемически значимых холерных вибрионов *Vibrio cholerae* El Tor и *Vibrio cholerae* O139 по их адгезивной способности. Патент № 2332460 РФ; заявл. 26.12.2006; опубл. 27.08.2008.
36. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. — 714 с.
37. Alamdary S.Z., Bakhshi B. *Lactobacillus acidophilus* attenuates toxin production by *Vibrio cholerae* and shigella dysenteriae following intestinal epithelial cells infection // Microb. Pathog. — 2020. — Vol. 149. — P. 104543.
38. Bhattaram V., Upadhyay A., Yin H.B., Mooyottu S., Venkitanarayanan K. Effect of dietary minerals on virulence attributes of *Vibrio cholera* // Front. Microbiol. — 2017. — Vol. 8. — P. 911.
39. Blanco L.P., DiRita V.J. Bacterial-associated cholera toxin and GM1 binding are required for transcytosis of classical

- biotype *Vibrio cholerae* through an in vitro M cell model system // Cell Microbiol. — 2006. — Vol. 8(6). — P. 982–998.
40. Bourque D.L., Bhuiyan T.R., Genereux D.P., Rashu R., Ellis C.N., Chowdhury F., Khan A.I., Alam N.H., Paul A., Hossain L., Mayo-Smith L.M., Charles R.C., Weil A.A., LaRocque R.C., Calderwood S.B., Ryan E.T., Karlsson E.K., Qadri F., Harris J.B. Analysis of the human mucosal response to cholera reveals sustained activation of innate immune signaling pathways // Infect Immun. — 2018. — Vol. 86(2). — P. e00594–17. doi: 10.1128/IAI.00594-17.
41. Boyd E.F., Heilpern A.J., Waldor M.K. Molecular analyses of a putative CTX $\phi$  precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX( $\phi$ )s by toxigenic *Vibrio cholerae* // J. Bacteriol. — 2000. — Vol. 182. — No. 19. — P. 5530–5538.
42. Chatterjee D., Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells // FEBS Lett. — 2011. — Vol. 585(9). — P. 1357–1362.
43. Fasano A. Toxins and the gut: Role in human disease // Gut. — 2002. — Vol. 50. — Suppl. 3. — P. 9–14.
44. Ghasemi M., Bakhshi B., Khashei R., Soudi S. Modulatory effect of *Vibrio cholerae* toxin co-regulated pilus on mucins, toll-like receptors and NOD genes expression in co-culture model of Caco-2 and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) // Microb. Pathog. — 2020. — Vol. 149. — P. 104566.
45. Kesty N.C., Mason K.M., Reedy M., Miller S.E., Kuehn M.J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells // EMBO J. — 2004. — Vol. 23(23). — P. 4538–4549.
46. Köckerling A., Fromm M. Origin of cAMP dependent Cl secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine // Am. J. Physiol. — 1993. — Vol. 264. — P. 1294–1301.
47. Lavanya G., Magesh C.J., Venkatapathy K., Perumal P.T., Prema S. Design, synthesis, spectral characterization and molecular docking studies of novel pyranoquinolinyl dihydro-pyridine carboxylates as potential antibacterial agents including *Vibrio cholerae* with minimal cytotoxicity towards fibroblast cell line (L-929) // Bioorg. Chem. — 2021. — Vol. 107: 104582. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104582.
48. Lesley A.C., Lauriane E.Q., Lois A.Z. Considerations for infectious disease research studies using animals // Comparative Medicine. — 2017. — Vol. 67(3). — P. 222–231.
49. Navolotskaya E.V., Sadovnikov V.B., Lipkin V.M., Zav'yalov V.P. Binding of cholera toxin B subunit to intestinal epithelial cells // Toxicol In Vitro. — 2018. — Vol. 47. — P. 269–273.
50. Perez-Reytor D., Jaña V., Pavez L., Navarrete P., Garcia K. Accessory toxins of *Vibrio* pathogens and their role in epithelial disruption during infection // Front. Microbiol. — 2018. — Vol. 9. — P. 2248.
51. Raahati Z., Bakhshi B., Najar-Peerayeh S. Selenium nanoparticles induce potent protective immune responses against *Vibrio cholerae* WC vaccine in a mouse model // J. Immunol Res. — 2020. — Article ID 8874288. doi: 10.1155/2020/8874288.
52. Satchell K.J.F. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins // Infect. Immun. — 2007. — Vol. 75. — No. 11. — P. 5079–5084.
53. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin // Science. — 1996. — Vol. 272. — No. 5269. — P. 1910–1914.
54. Walia K., Ganguly N.K. Epidemiological and molecular aspects on cholera / T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya (eds.). — Springer Science Business Media, 2010. — Ch. 15. — P. 259–274.

## References

1. Alekseyeva LP, Sal'nikova OI, Lobanov VV, Olenicheva LS, Pomukhina OI. Vzaimodeystviye kholernogo toksina s kul'turoy kitayskogo khomyachka (SNO) v prisutstvii biologicheskii aktivnykh veshchestv kholernogo vibriona. 2-ya Vsesoyuznaya konferentsiya «Bakterial'nyye toksiny» (27–30 noyabrya 1989). Yurmala, Latvija, 1989: 3 (in Russian).
2. Alekseyeva LP, Yakusheva OA, Zyuzina VP, Duvanova OV, Shipko YeS, Pisanov RV. Sovremennyye metodicheskiye priyemy ochistki kholernogo toksina. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova 2019; 15(1):5–9 (in Russian).
3. Andrusenko IT, Bardykh ID. Lekarstvennyye rasteniya pri lechenii kholery (obzor literatury). Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya 2008; 5:21–25 (in Russian).
4. Vishnevskaya ON. Pronitsayemost' stenki toshchey kishki krysy pri vozdeystvii kholernogo toksina i lipopolisakharida. Dis na soiskaniye uchenoy stepeni kbn. St. Petersburg, 2018:109 (in Russian).
5. Gayeva AV, Generalov SV, Durakova OS, Gromova OV, Livanova LF, Volokh OA. Otsenka aktivnosti kholernogo toksina pri proizvodstve kholernoy khimicheskoy vaksiny na modeli perevivayemoy linii kletok SNO-K1. Obespecheniye sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya v gosudarstvakh-uchastnikakh SNG: Materialy XIV Mezghosudarstvennoy nauchn-prakt konf, posvyaschch 100-letiyu FKUZ RosNIPCHI «Mikrob». Pod red dokt med nauk, prof AYu Popovoy, akad RAN, dokt med nauk, prof VV Kutyreva. Saratov: Amirit, 2018: 99–101 (in Russian).
6. Gayeva AV, Gromova OV, Durakova OS, Generalov SV, Livanova LF, Volokh OA. Opredeleniye spetsificheskoy aktivnosti komponentov kholernoy khimicheskoy vaksiny s ispol'zovaniyem kletochnoy kul'tury. Biotekhnologiya 2020; 36(3)82–89 (in Russian).
7. Goryayev AA, Sayapina LV, Obukhov YuI, Bondarev VP. Effektivnost' i bezopasnost' vaksiny dlya profilaktiki kholery.

- BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye 2018; 1:42–49 (in Russian).
8. Durakova OS, Gromova OV, Gayeva AV, Generalov SV, Livanova LF, Klokov OA. Eksperimental'noye obosnovaniye vozmozhnosti ispol'zovaniya perevivayemoy linii kletok SNO-K1 dlya opredeleniya spetsificheskoy aktivnosti komponentov kholernoy khimicheskoy vaksiny. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2019; 4:113–116 (in Russian).
  9. Katalog Rossiyskoy kolleksii kletochnykh kul'tur pozvonochnykh (RKKK P). Elektronnyy resurs. URL: [https://www.incras.ru/wp-content/uploads/2019/06/katalog\\_rccc\\_v\\_2018\\_rus.pdf](https://www.incras.ru/wp-content/uploads/2019/06/katalog_rccc_v_2018_rus.pdf) (Data obrashcheniya: 16.04.2021).
  10. Koroleva GV, Korol' VV, Smolikova LM i dr. Adgezivnyye svoystva vibriionov raznykh vidov i 122 adgezivnykh preparatov. Kholera. Vopr epidemiol, mikrobiol i lab. Diagnost: Mater Ros nauch konf. Rostov-na-Donu, 1992: 88–89 (in Russian).
  11. Korshenko VA, Cherepakhina IYa, Yakusheva OA, Alekseyeva LP. Rol' antilaktoferrinovy aktivnosti v adgezii kholernykh vibriionov. Fundamental'nyye issledovaniya 2015; 1–5:967–971 (in Russian).
  12. Korshenko VA. Antilaktoferrinovaya aktivnost' kholernykh vibriionov. Dis na soiskaniye uchenoy stepeni kandidata biologicheskikh nauk. Gosudarstvennyy nauchnyy tsentr prikladnoy mikrobiologii i biotekhnologii Rospotrebnadzora. Obolensk, 2016: 144 (in Russian).
  13. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney. Prakticheskoye rukovodstvo. Pod red akademika RAMN, professora GG Onishchenko, chl-korr RAMN, professora VV Kutyreva. Moscow: OAO «Izdatel'stvo «Meditsina», izdatel'stvo «Shiko», 2009: 62–99 (in Russian).
  14. Laboratornaya diagnostika kholery: MUK 4.2.2218–07. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2007: 87 (in Russian).
  15. Markina OV, Alekseyeva LP, Markin NV, Telesmanich NR. Vliyaniye ekstraktov rasteniy na aktivnost' kholernogo toksina *Vibrio cholerae*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2013; 1:9–13 (in Russian).
  16. Markina OV, Alekseyeva LP, Markin NV. Vliyaniye ekstraktov rasteniy na tsitotoksicheskuyu aktivnost' gemolizina *Vibrio cholerae*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2013; 4:10–16 (in Russian).
  17. Markina OV, Monakhova YeV, Alekseyeva LP, Pisanov RV. Izucheniye biologicheskogo deystviya gemagglutinin/proteazy kholernykh vibriionov na modeli kul'tur kletok. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2007; 2(94):58–61 (in Russian).
  18. Markina OV. Izucheniye toksinoproduktiruyushchey sposobnosti shtammov *Vibrio cholerae* O1 i *Vibrio cholerae* O139 s pomoshch'yu immunofermentnogo analiza i kul'tury kletok. Dis na soiskaniye uchenoy stepeni kbn. Stavropol', 2008: 139 (in Russian).
  19. Monakhova YeV, Mazrukho AB. Toksiny kholernykh vibriionov: puti realizatsii vzbuditelem patogennykh svoystv. Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony: Materialy problemnoy komissii (48.04) Koordinatsionnogo nauchnogo soveta po sanitarno-epidemiologicheskoy okhrane territorii Rossiyskoy Federatsii. Donizdat, 2012: 101–108 (in Russian).
  20. Monakhova YeV, Pisanov RV, Mazrukho AB, Markina OV, Alekseyeva LP. Kharakteristika kholernogo vibriiona Cef (faktor udlineniya kletok SNO): bioinformatsicheskii analiz i eksperimental'nyye dannyye. Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya 2012; 27:56–60 (in Russian).
  21. Monakhova YeV, Pisanov RV, Titova SV, Yezhova MI, Ivanov SA. Variabel'nost' genov cef toksigennykh i netoksigennykh shtammov *Vibrio cholerae* O1. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2017; 4:50–55 (in Russian).
  22. Monakhova YeV. Faktory patogennosti nekholerogennykh shtammov *Vibrio cholerae*. Avtoreferat na soiskaniye uchenoy stepeni dbn. Rostov-na-Donu, 2012: 46 (in Russian).
  23. Moskvitina EA, Yanovich YeG, Kurilenko ML, Kruglikov VD, Titova SV, Levchenko DA, Vodop'yanov AS, Lopatin AA, Ivanova SM, Mishan'kin BM, Krivenko AS, Anisimova GB, Noskov AK. Kholera: monitoring epidemiologicheskoy obstanovki v mire i Rossii (2010–2019 gg). Prognoz na 2020 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 2:38–47 (in Russian).
  24. Mokhov AA, Murashev AN, Krasil'shchikova MS, Khokhlova ON, Semushina SG, Rasskazova YeA, Rzhavskiy DI, Popov VS, Yavorskiy AN. O neobkhodimosti sovershenstvovaniya zakonodatel'stva v sfere ispol'zovaniya laboratornykh zhitovnykh. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya 2016; 4:62–67 (in Russian).
  25. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Monakhova YeV, Levchenko DA, Yanovich YeG, Vodop'yanov AS, Pisanov RV, Nepomnyashchaya NB, Yezhova MI, Podoymitsyna OA. Kharakteristika epidemiologicheskoy situatsii po kholere v mire i v Rossiyskoy Federatsii v 2020 g. i prognoz na 2021 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2021; 1:43–51 (in Russian).
  26. Pimenova YeV, Khrapova NP, Zamarina TV. Dostizheniya v issledovanii virusa denge: modeli kletochnykh liniy i vozmozhnosti ikh ispol'zovaniya. Vestnik VolGMU 2020; 1(73):14–19 (in Russian).
  27. Pisanov RV. Konstruirovaniye shtamma *Escherichia coli*, ekspressiruyushchego gen zonula occludens toxin *Vibrio cholerae*. Avtoreferat na soiskaniye uchenoy stepeni kbn. Rostov-na-Donu, 2004: 22 (in Russian).
  28. Polyanskaya GG. Razvitiye kolleksii kul'tur kletok pozvonochnykh, sozdannoy prof GP Pinayevym. Kletochnyye kul'tury. Informatsionnyy byulleten'. Vypusk 35. Otv red MS Bogdanova. St. Petersburg: Izd-vo Politekhn un-ta, 2019: 3–24 (in Russian).

29. Rossiyskaya kolleksiya kletochnykh kul'tur. Elektronnyy resurs. URL: <https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/rossijskaja-kollekcija-kletochnyh-kultur/> (Data obrashcheniya: 16.04.2021).
30. Sal'nikova OI, Alekseyeva LP, Smirnova OV, Mazrukho AB. Ispol'zovaniye tverdogaznogo SNO–IFA dlya testirovaniya kholernogo toksina. *Biotekhnologiya* 2000; 2:73–78 (in Russian).
31. Sappo SG, Urbanovich LYa, Kolesnik VS. Ispol'zovaniye eritrotsitov dlya vyyavleniya adgezivnoy sposobnosti vibri-onov. *Sovremennyye aspekty profilaktiki zoonoznykh infektsiy. Irkutsk, 1984; Ch 3:126–127* (in Russian).
32. Sayamov SR, Monakhova YeV, Fedorenko GM, Tkacheva TI, Markina OV, Alekseyeva LP, Pisanov RV, Bardakh-chyan YeA. Izmeneniya ul'trastruktury v kul'tiviruyemykh kletkakh pod deystviyem gemagglutinin/proteazy kholernogo vibri-ona. *Vestnik eksperimental'noy biologii i meditsiny* 2012; 152:456–460 (in Russian).
33. Simonova IR, Bereznyak YeA, Trishina AV. Rol' eksperimental'nykh biologicheskikh modeley v izuchenii osobo opasnykh infektsiy i sovremennyye aspekty obespech-eniya biologicheskoy bezopasnosti. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2020; 16(3):52–59 (in Russian).
34. Tatarenko OA, Korshenko VA, Alekseyeva LP, Cherepak-hina IYa. Sposob otsenki adgezivnykh svoystv kholernykh vibri-onov *Vibrio cholerae* El Tor i *Vibrio cholerae* O139 na kletochnoy kul'ture HuTu-80. Patent № 2595423 RF; zayavl 09.12.2014; opubl 27.08.2016 (in Russian).
35. Telesmanich NR, Lomov YuM, Kolyakina AV. Sposob vyy-avleniya epidemicheskikh znachimykh kholernykh vibri-onov *Vib-rio cholerae* El Tor i *Vibrio cholerae* O139 po ikh adgezivnoy sposobnosti. Patent № 2332460 RF; zayavl 26.12.2006; opubl 27.08.2008 (in Russian).
36. Freshni RYa. Kul'tura zhivotnykh kletok: prakticheskoye rukovodstvo. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy, 2010: 714 (in Russian).
37. Alamdary SZ, Bakhshi B. *Lactobacillus acidophilus* at-tenuates toxin production by *Vibrio cholerae* and shigella dysenteriae following intestinal epithelial cells infection. *Microb Pathog* 2020; 149:104543.
38. Bhattaram V, Upadhyay A, Yin HB, Mooyottu S, Venkita-narayanan K. Effect of dietary minerals on virulence attributes of *Vibrio cholera*. *Front Microbiol* 2017; 8:911.
39. Blanco LP, DiRita VJ. Bacterial-associated cholera toxin and GM1 binding are required for transcytosis of classical biotype *Vibrio cholerae* through an in vitro M cell model system. *Cell Microbiol* 2006; 8(6):982–998.
40. Bourque DL, Bhuiyan TR, Genreux DP, Rashu R, Ellis CN, Chowdhury F, Khan AI, Alam NH, Paul A, Hossain L, Mayo-Smith LM, Charles RC, Weil AA, LaRocque RC, Calderwood SB, Ryan ET, Karlsson EK, Qadri F, Harris JB. Analysis of the human mucosal response to cholera reveals sustained activation of innate immune signaling pathways. *Infect Immun* 2018; 86(2):e00594–17. doi: 10.1128/IAI.00594-17.
41. Boyd EF, Heilpern AJ, Waldor MK. Molecular analyses of a putative CTX<sub>phi</sub> precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX(φ)s by toxigenic *Vibrio chol-erac*. *J Bacteriol* 2000; 182(19):5530–5538.
42. Chatterjee D, Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internal-ized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett* 2011; 585(9):1357–1362.
43. Fasano A. Toxins and the gut: Role in human disease. *Gut* 2002; 50(Suppl 3):9–14.
44. Ghasemi M, Bakhshi B, Khashei R, Soudi S. Modulatory effect of *Vibrio cholerae* toxin co-regulated pilus on mucins, toll-like receptors and NOD genes expression in co-culture model of Caco-2 and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Microb Pathog* 2020; 149:104566.
45. Kesty NC, Mason KM, Reedy M, Miller SE, Kuehn MJ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J* 2004; 23(23):4538–4549.
46. Köckerling A, Fromm M. Origin of cAMP dependent Cl secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am J Physiol* 1993; 264:1294–1301.
47. Lavanya G, Magesh CJ, Venkatapathy K, Perumal PT, Prema S. Design, synthesis, spectral characterization and molecular docking studies of novel pyranoquinolinyl dihydro-pyridine carboxylates as potential antibacterial agents including *Vibrio cholerae* with minimal cytotoxicity towards fibroblast cell line (L-929). *Bioorg Chem* 2021; 107:104582. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104582.
48. Lesley AC, Lauriane EQ, Lois AZ. Considerations for in-fectious disease research studies using animals. *Comparative Medicine* 2017; 67(3):222–231.
49. Navolotskaya EV, Sadovnikov VB, Lipkin VM, Zav'yalov VP. Binding of cholera toxin B subunit to intestinal epithelial cells. *Toxicol In Vitro* 2018; 47:269–273.
50. Perez-Reytor D, Jaña V, Pavez L, Navarrete P, Garcia K. Accessory toxins of *Vibrio* pathogens and their role in epithelial disruption during infection. *Front Microbiol* 2018; 9:2248.
51. Raahati Z, Bakhshi B, Najar-Peerayeh S. Selenium nanopar-ticles induce potent protective immune responses against *Vibrio cholerae* WC vaccine in a mouse model. *J Immunol Res* 2020; Art. ID 8874288. doi: 10.1155/2020/8874288.
52. Satchell KJF. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infect Immun* 2007; 75(11):5079–5084.
53. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 1996; 272(5269):1910–1914.
54. Walia K, Ganguly NK. Epidemiological and molecular aspects on cholera. T Ramamurthy, SK Bhattacharya (eds). Springer Science Business Media, 2010; Ch 15:259–274.

## MODELS OF CELL LINES AND THE POSSIBILITY OF THEIR USE IN THE STUDY OF THE PROPERTIES OF *VIBRIO CHOLERAЕ*

O.F. KRETENCHUK, V.A. KORSHENKO, I.A. SHCHIPELEVA

*Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of the Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don*

The review presents data on various models of transplanted cell lines that are used as an alternative to biological objects to obtain new information about *Vibrio cholerae*. The literature sources from the databases of electronic libraries e-library, PubMed, CyberLeninka and others are analyzed. The possibilities and prospects of research using cellular technologies are shown.

*Keywords:* cell lines, cholera, *Vibrio cholerae*, toxin, adhesion, cholera vaccine.

### Address:

Kretenchuk O.F., Ph.D.  
Senior Researcher, Scientific Department,  
FKUZ Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Rosпотребнадзор  
E-mail: oksidjinf@mail.ru,

### Для цитирования:

Кретенчук О.Ф., Коршенко В.А., Шчипелева И.А. Модели клеточных линий и возможности их использования при изучении свойств холерных вибрионов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(3):69–78.

### For citation:

Kretenchuk O.F., Korshenko V.A., Shchipeleva I.A. Models of cell lines and the possibility of their use in the study of the properties of *Vibrio cholerae*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(3):69–78 (in Russian).

### ERRATUM

В № 1 тома 17 журнала «Вестник биотехнологии...» в обзорной статье Лобановой В.А., Клюкиной В.И. вместо рисунка 3 ошибочно повторен рисунок 1 (стр. 67). Эта досадная оплошность не влияет на смысловую часть текста, ссылающуюся на верную оригинальную иллюстрацию (см. ссылку № 23 в указанной статье).

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](http://www.biorosinfo.ru)).



Подписано к печати 30.09.2021  
Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

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