

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

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

Scientific and practical journal

Founded in 2005

Chief editor

R.G. Vasilov

Editorial board

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

Editorial council

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

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

Head edited by O.V. Colombet

Address: 123060, Moscow, PO Box 3

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

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

Founder and Publisher:

ANO «Information and Analytical Center
medical and social problems»

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

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

E-mail: raifvasilov@mail.ru

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

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 5

Оригинальные статьи

Усовершенствование производственного цикла вакцины чумной живой путем модернизации биотехнологического оборудования.

Н.В. Абзаева, С.Е. Гостищева, А.В. Костроминов, М.В. Пилипенко, Г.Ф. Иванова, А.А. Фисун, О.Л. Старцева, М.А. Иванова 6

Конструирование магнитного иммуносорбента для селективного концентрирования спор сибиреязвенного микроба.

И.В. Жарникова, А.С. Геогджаян, А.А. Семирчева, Ю.Ю. Гаркуша, Е.В. Жданова, С.А. Курчева, Д.В. Русанова, Е.Н. Афанасьев 13

Безмембранный микробный биотопливный элемент, работающий на дождевых сточных водах.

Д.А. Харьков, М.П. Жиянова, М.В. Вишневецкая 19

Полисенарная концепция совершенствования законодательства в сфере геномных технологий в Российской Федерации: стимулирование, безопасность и устранение межотраслевых правовых противоречий.

Ю.А. Петушкова, П.А. Каменский 25

Оценка гуморального иммунного ответа на введение холерных бактериофагов у экспериментальных животных.

А.В. Тюрина, Л.В. Ларионова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.А. Труфанова, Д.И. Симакова, И.А. Иванова, Н.Е. Гаевская, М.П. Погужова, А.О. Аноприенко, Н.И. Пасюкова 36

Разработка тест-системы на основе ПЦР для молекулярно-генетической идентификации бактерий *Pseudomonas stutzeri*.

Т.А. Федотова, И.И. Богданов, А.В. Мастиленко, А.А. Ломакин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев 42

Изучение чувствительности бактерий вида *Pseudomonas stutzeri* и их ассоциатов к различным красителям.

Т.А. Федотова, И.И. Богданов, Д.А. Васильев, Л.П. Пульчеровская 54

Потенциал рецепторной системы на основе ассоциации бактерий *Escherichia coli* K802 и *Paracoccus yeei* ВКМ-3302 для экспресс-оценки БПК₅.

А.С. Харькова, В.А. Арляпов, С.К. Курбаналиева, Р.В. Лепикаш 59

Страницы истории

К 200-летию со дня рождения Фрэнсиса Гальтона, выдающегося английского ученого-энциклопедиста, основателя евгеники.

В.С. Воробьев 69

Хроника 76

Правила для авторов 79

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Improving the production cycle of live plague vaccine by upgrading biotechnological equipment.
*N.V. Abzaeva, S.E. Gostischeva, A.V. Kostrominov, M.V. Pilipenko,
G.F. Ivanova, A.A. Fisun, O.L. Startseva, M.A. Ivanova* 6

Construction of a magnetic immunosorbent for the selective concentration of anthrax microbe spores.
*I.V. Zharnikova, A.S. Geogjayan, A.A. Semircheva, Yu.Yu. Garkusha,
E.V. Zhdanova, S.A. Kurcheva, D.V. Rusanova, E.N. Afanasiev*..... 13

Membraneless microbial biofuel cell powered by rainwater .
D.A. Kharkov, M.P. Zhiyanova, M.V. Vishnevskaya 19

Polyscenario concept for the legislation improvement in the field of genetic technologies in the Russian Federation:
promotion, safety, cross-sectoral conflicts of laws elimination.
Yu.A. Petushkova, P.A. Kamenski..... 25

Assessment of the humoral immune response to the introduction of cholera bacteriophages in experimental
animals.
*A.V. Tyurina, L.V. Larionova, A.V. Filippenko, N.D. Omelchenko,
A.A. Trufanova, D.I. Simakova, I.A. Ivanova, N.E. Gaevskaya,
M.P. Pogozhova, A.O. Anoprienko, N.I. Pasukova* 36

Development of a PCR-based test system for molecular genetic identification of *Pseudomonas stutzeri*
bacteria.
*T.A. Fedotova, I.I. Bogdanov, A.V. Mastilenko, A.A. Lomakin,
L.P. Pulcherovskaya, D.A. Vasilyev* 42

Study of the sensitivity of bacteria of the species *Pseudomonas stutzeri* and their associates to various dyes.
T.A. Fedotova, I.I. Bogdanov, D.A. Vasilyev, L.P. Pulcherovskaya 54

Potential of the receptor system based on the association of bacteria *Escherichia coli* K802 and *Paracoccus
yei* VKM-3302 for rapid assessment of BOD₅.
A.S. Kharkova, V.A. Arlyapov, S.K. Kurbanaliyeva, R.V. Lepikash..... 59

Pages of history

To the 200th anniversary of the birth of Francis Galton.
V.S. Vorobyev 69

The chronicle 76

Rules for authors 79

К читателям

Во втором номере журнала подобраны в основном оригинальные статьи. В исследовании Абзаевой Н.В. с коллегами (Ставропольский противочумный институт) была осуществлена модернизация аппарата для культивирования микроорганизмов. Внесенные изменения касались вращения и длительности выдерживания сред внутри аппарата. Контрольные параметры смывной микробной взвеси соответствовали регламентированным нормам.

Группа сотрудников из того же учреждения (Жарникова И.В. и др.) разработала магнитные иммуносорбенты для селективного концентрирования спор сибиреязвенного микроба. Установлена способность этих иммуносорбентов прочно фиксировать на своей поверхности споры *B. anthracis*.

Сотрудники московских учреждений (МГУ, НИЦ «Курчатовский институт» и др.) показали, что безмембранный микробный биотопливный элемент может стабильно работать в течение 35 дней и при этом генерировать мощность до 19 мВт/м² в последний день работы.

Петушкова Ю.А., Каменский П.А. из биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова рассмотрели вопрос о разработке концепции совершенствования законодательства в сфере геномных технологий.

Многочисленный коллектив сотрудников Ростовского-на-Дону противочумного института (Тюрина А.В. и др.) провел оценку гуморального иммунного ответа на введение холерных бактериофагов у экспериментальных животных. Продемонстрировано, что однократное курсовое применение препаратов как в отдельности, так и в смеси не вызывает формирования специфических к холерным бактериофагам антител. Однако повторное их применение приводит к появлению антифаговых иммуноглобулинов класса G.

Авторы из Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина (Федотова Т.А. и др.) представили две статьи, посвященные молекулярно-генетическому исследованию бактерии *Pseudomonas stutzeri* с помощью тест-систем на основе ПЦР и установлению ее чувствительности к различным красителям.

Харькова А.С. и др. из Тульского государственного университета определили потенциал рецепторной системы на основе ассоциации бактерий *Escherichia coli* и *Paracoccus yei* для экспресс-оценки БПК₅.

В хронике текущих событий помещены материалы к 200-летию со дня рождения ученого-энциклопедиста, основателя евгеники Фрэнсиса Гальтона, а также краткие мемориальные данные, посвященные 100-летней дате со дня рождения первооткрывателей генетического кода Хара Гобинда Кораны и Роберта Уильяма Холли.

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

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ЦИКЛА ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ ПУТЕМ МОДЕРНИЗАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ

Н.В. АБЗАЕВА, С.Е. ГОСТИЩЕВА*, А.В. КОСТРОМИНОВ, М.В. ПИЛИПЕНКО,
Г.Ф. ИВАНОВА, А.А. ФИСУН, О.Л. СТАРЦЕВА, М.А. ИВАНОВА

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора», Ставрополь

Проведена модернизация конструкции аппаратов для культивирования микроорганизмов Шестеренко, эксплуатируемых в настоящее время. Заменена система фильтрации воздуха и отработаны режимы ее стерилизации. Внедрена проверка на целостность мембраны путем диффузного потока. Выполнено оснащение аппаратов асептическими мембранными клапанами и мембранными фильтрами с CLAMP соединениями. Контрольные приборы управления заменены на современные аналоги, позволяющие программировать и анализировать процесс культивирования. Было уменьшено перекачки агара в ферментер путем применения перистальтической системы. Упрощена конструктивная схема использования механизма коромысла для распределения посевного материала и смыва микробной массы. Внесенные изменения касались количества вращений и длительности выдерживания сред внутри аппарата. Осуществлена сравнительная характеристика качества смывой микробной взвеси до и после упрощения механизма распределения. Показано, что в обоих случаях параметры биомассы соответствовали регламентированным нормам. Таким образом, внесенные в конструкцию биореактора изменения оптимизируют технологический этап культивирования вакцинного штамма, что позволяет стабилизировать качество вакцины по показателю жизнеспособности.

Ключевые слова: аппарат для культивирования микроорганизмов, модернизация, вакцина чумная живая, биотехнология, биомасса.

Введение

Препарат «вакцина чумная живая» представляет собой лиофилизат взвеси микробных клеток вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ в стабилизаторе и предназначается для иммунизации контингента, проживающего на энзоотичных по чуме территориях и лиц, работающих непосредственно с возбудителем чумы [8, 16, 17].

Биотехнология производства вакцины чумной живой построена на последовательном выполнении регламентированных этапов производственного цикла. Повышение качества и стандартизация вакцинного препарата являются главными задачами при его совершенствовании. Оптимизация отдельных этапов приготовления противочумной

вакцины при неизменности самих биотехнологических стадий — это одно из основных направлений по улучшению конечных показателей ее качества. В ампуле с готовым препаратом может содержаться от 80 до 430 доз, при этом характеристики каждой серии препарата во многом зависят от качества полученной в ферментере биомассы [10].

Для производства вакцины чумной живой в ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» используются аппараты для культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш).

Аппарат движется в круговую вокруг продольной и поперечной осей для лучшего распределения агара по кюветам, оснащен коромыслами с лопатками для увеличения количества смываемой бактериальной взвеси, имеет систему аэрирования стерильным воздухом через специальные фильтры и возможность выставления различных температурных режимов культивирования и параметров стерилизации [9]. За счет своей конструкции АКМ-Ш технологически решал проблему наиболее рационального использования плотных питательных сред, создавая возможность повторного выращивания после проведения обогащения использованного агара и обеспечивал получение значительных объемов биомассы вакцинного штамма чумного микроба [7].

© 2022 г. Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Костроминов А.В., Пилипенко М.В., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Старцева О.Л., Иванова М.А.

* Автор для переписки:

Гостищева Светлана Евгеньевна
кандидат биологических наук, биолог научно-производственной лаборатории чумных вакцин. ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора», Ставрополь
E-mail: chumnp1@yandex.ru

При интенсивной эксплуатации этих ферментеров к настоящему времени авторы выявили ряд проблем:

- сильфонные краны и стерилизуемые фильтры с ватной набивкой, имеющие сложную конструкцию с нагревателями для стерилизации и прогрева (осушение) ваты фильтра, часто давали риск контаминации посторонней микрофлорой;

- частые поломки системы термостатирования, затрудняющие поддержание стабильной температуры культивирования в течение всего цикла выращивания;

- система контрольно-измерительных приборов не обеспечивала координацию соблюдения заданных параметров эксплуатации, что требовало постоянного присутствия оператора;

- транспортировка агара непосредственно в ферментер проводилась путем создания вакуума (конструктивные особенности ферментера), что могло служить причиной контаминации.

Современные ферментеры, производимые в настоящее время, предназначены для глубинного культивирования микроорганизмов на жидких питательных средах [1, 2, 4–6, 12]. Такой метод получения биомассы ранее применялся в производстве чумной вакцины наряду с поверхностным на плотных питательных средах [13], но был исключен из нормативной документации и практического использования. Однако вакцинный препарат, получаемый в АКМ-Ш, по своим характеристикам имеет ряд преимуществ над «бульонной» вакциной [14]. Поэтому было принято решение максимально модернизировать имеющееся в лаборатории оборудование и алгоритмы его эксплуатации.

Учитывая вышеизложенное, целью работы было усовершенствование производственного цикла вакцины чумной живой путем осуществления модернизации конструкции аппарата для культивирования микроорганизмов Шестеренко и отработки механизмов его эксплуатации.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» (депонирован в ГКПМ III–IV групп патогенности ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России под № 910301).

Получение биомассы. Выращивание вакцинного штамма проводили в аппарате для культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш, Московский

экспериментальный завод «Технолог»). Для засева использовали посевную культуру, изготовленную путем последовательных пересевов на этапах I, II и III генерации вакцинного штамма согласно Промышленному регламенту на производство вакцины чумной живой (ПР 01897080-09-16). Культивировали при температуре 27 ± 1 °C 48 ч, при периодической аэрации через 1,5–2 ч по 10–15 мин. Биомассу смывали двукратно последовательно стабилизатором (тиомочевинная среда высушивания). Определяли в обоих смывах показатели оптической концентрации по ОСО мутности 10 единиц соответствующего года выпуска и процент живых микробных клеток.

Опыт проводили в трехкратном повторе.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Первым шагом по внесению конструктивных изменений стали работы по демонтажу и подбору системы фильтрации воздуха с отработкой режимов стерилизации. Для этого произвели замену устаревших фильтров с ватной набивкой на современные мембранные гидрофобные картриджи с порами 0,2 мкм, изготовленные из политетрафторэтилена, а именно: корпуса под фильтры demi HSI Plus санитарный, 316L, под фильтроэлементы 5" на Т 126, вход/выход 1½" Tri-Clamp, с дренажами и фильтроэлементы domnick hunter HF Tetpor II стерилизующий, PTFE, 5" на Т 126 [3].

Такие фильтровальные системы гидрофобны и не взаимодействуют с содержащейся в окружающей среде влагой, позволяя воздуху проходить беспрепятственно при низких дифференциальных давлениях. Проверка на целостность мембраны осуществляется путем диффузного потока с помощью приборов, подобных «BEVCHECK» как на картриджах, демонтированных с ферментера, так и непосредственно на нем, что существенно снижает риск контаминации при аэрации.

Для улучшения качества стерилизации ферментера и засева портов (разъемов) вместо устаревших сильфонных кранов, установленных заводом-изготовителем, аппарат был оснащен асептическими мембранными клапанами и мембранными фильтрами (краны мембранные SED KMA 905 вход/выход 1" Tri-Clamp) с CLAMP соединениями [11].

Стерилизацию АКМ-Ш разбили на два этапа. Первый — стерилизация фильтров и мембранных кранов согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Второй — стерилизация непосредственно ферментера и засевных портов. Такой алгоритм значительно уменьшает возможность контаминации посторонней микрофлорой, особенно при подсоединении емкостей с засеваемой бактериальной массой или средой для ее смыва.

Для корректной работы АКМ-Ш потребовалась замена автоматики, отвечающей за процессы стерилизации, термостатирования, аэрации и других на более современные аналоги, позволяющие программировать и анализировать процесс культивирования. Таким шагом стало обновление контрольных приборов управления. Электроконтактные термометры были заменены на резистивные датчики с чувствительными элементами Pt 100, подключённые к 2ТРМО. Приводы вертикального и горизонтального вращения подсоединили через частотные преобразователи, что позволило варьировать скорость наклона и вращения для дальнейшей отработки техники распределения агара/среды высушивания, а также процесса смыва микробной массы.

Все системы контроля за операциями по эксплуатации были заменены на современные аналоги:

- система автоматического контроля давления в аппарате с диапазоном измерения и контроля от 1–3 кг/кв.см, состоящая из стерилизуемого датчика давления с клапаном под управлением контроллера давления;
- система контроля перепада давления на фильтрах в момент стерилизации, не позволяющая превысить отметку в 5 psid;
- система предварительной подготовки воздуха, включающая в себя безмасляный компрессор GREENWOORK, с блоком фильтрации и влагоотделителем PARKER DL 2 ZL, CP1008ZL;

- система термостатирования по принципу «закрытый контур» с циркуляционным насосом для подачи теплоносителя в контур термостатирования, теплообменником, регулирующей арматурой.

Самым сложным этапом стало восстановление безотказной работы механизма опускания коромысел с лопатками для лучшего распределения посевного материала/среды высушивания по агару. Было проведено упрощение конструктивной схемы механизма с доработкой технологии распределения посевного материала и смыва микробной массы. Внесенные изменения касались количества вращений и длительности выдерживания сред внутри аппарата.

Теперь процесс распределения среды высушивания и смыва микробной массы происходит следующим образом. Емкость со средой высушивания через специальную систему монтажей подсоединяют к посевному порту и перекачивают жидкость в аппарат. Затем емкость отсоединяют, реактор наклоняют и вращают со скоростью 10 об/мин в течение 3 мин, после чего ставят корпус аппарата вертикально с экспозицией 40 мин. За это время среда высушивания размягчает нарощенную микробную массу, что облегчает ее дальнейший смыв. По истечении времени АКМ-Ш снова наклоняют горизонтально и вращают 3 мин со скоростью 10 об/мин для лучшего отхождения биомассы. Аппарат возвращают в вертикальное положение, подсоединяют бутылку для смыва и сливают полученную взвесь. Операцию повторяют дважды, используя новую емкость со средой высушивания и вторую бутылку для слива биомассы вакцины. Процесс засева ферментера происходит по аналогичной схеме одной бутылкой с посевной (маточной) культурой.

Полученные данные по качеству смывной микробной взвеси до и после упрощения механизма распределения представлены в таблицах № 1, 2.

Таблица 1

Показатели качества микробной взвеси вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV, полученной до модернизации АКМ-Ш

Период выращивания	Показатели качества			
	Первичный смыв		Вторичный смыв	
	Оптическая концентрация суспензии, млрд.м.к./мл	Жизнеспособность, %	Оптическая концентрация суспензии, млрд.м.к./мл	Жизнеспособность, %
2017 г.	80,0	77,8	30,0	73,8
	70,0	87,0	20,0	82,0
	80,0	87,5	30,0	86,7
	70,0	80,5	30,0	76,1
	80,0	85,8	20,0	78,0
	70,0	90,3	30,0	84,7
	60,0	88,6	20,0	88,9
	80,0	87,5	30,0	89,5

2018 г.	100,0	80,5	20,0	92,3
	90,0	90,4	20,0	92,0
	130,0	92,3	50,0	70,5
	90,0	90,9	30,0	75,5
	100,0	83,6	30,0	73,8
	120,0	81,4	40,0	70,7
	110,0	84,3	30,0	84,4
	90,0	90,9	20,0	91,4
M±m	88,8±4,8	86,2±1,1	28,1±2,1	81,9±2,0

Таблица 2

**Показатели качества микробной взвеси вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV,
полученной после модернизации АКМ-Ш**

Период выращивания	Показатели качества			
	Первичный смыв		Вторичный смыв	
	Оптическая концен- трация суспензии, млрд.м.к./мл	Жизнеспособность, %	Оптическая концен- трация суспензии, млрд.м.к./мл	Жизнеспособность, %
2019 г.	70,0	92,4	20,0	89,8
	70,0	94,7	20,0	81,1
	70,0	89,0	20,0	79,8
	100,0	88,3	30,0	95,3
	90,0	94,4	30,0	90,8
	80,0	88,5	30,0	89,5
2020 г.	110,0	87,4	40,0	83,2
	110,0	88,0	50,0	89,5
	70,0	91,6	20,0	83,0
	120,0	88,3	50,0	95,6
	120,0	89,6	40,0	95,3
	80,0	90,2	10,0	84,5
M±m	90,8±6,9	90,2±1,2	30,0±3,7	88,1±1,6

Анализ полученных данных показывает, что биомасса, смытая с плотной питательной среды в АКМ-Ш, по своим качественным характеристикам соответствует регламентированным нормам. Это подтверждает целесообразность внесения в конструкцию биореактора изменений, что позволяет стабилизировать качество вакцины по показателю общей (оптической) и биологической (жизнеспособность) концентрации.

Помимо выше озвученных усовершенствований, для приведения этапа культивирования к принципам надлежащей производственной практики были внесены и отработаны дополнительные моменты эксплуатации препарата.

Так, закачка расплавленного агара проводилась путем обеспечения вакуума ферментера по рекомендации завода-изготовителя и исходя из конструктивных особенностей ферментера. Для удобства процесса и приведения к минимуму риска контаминации продукта посторонней микрофлорой был использован перистальтический насос 620 S WATSON MARLOW, при этом время перекачки сократилось до 10 мин вместо 60.

Согласно правилам надлежащей производственной практики, принятие существенных изменений процесса

производства, включая любые изменения оборудования, должно быть основано на анализе рисков и проведении внеплановых работ по валидации и квалификации [15]. При идентификации рисков были учтены контрольные критические точки вспомогательных операций по подготовке АКМ-Ш к работе, а также все контролируемые параметры, связанные с изменениями и оказывающие влияние на качество конечного продукта. Разработаны корректирующие действия в отношении категории значимых рисков для снижения их экспертной оценки до приемлемого минимума.

При проведении квалификации АКМ-Ш и тестировании основных операционных критериев показана работоспособность аппарата в пределах заявленных параметров без отклонений.

Валидацию технологического процесса выращивания микробной массы на плотной питательной среде в АКМ-Ш осуществляли с учетом воспроизводимости трех последовательных операций. Валидируемые параметры процесса соответствовали критическим точкам стадий Промышленного регламента на производство.

Увеличение времени технологических этапов засева посевного материала и смыва микробной массы не

отразилось на качестве препарата, а несущественная потеря в количестве готового продукта компенсируется минимизацией рисков контаминации.

Работа в асептических условиях, использование стерильных перистальтических систем для перекачки агара, посевного материала и среды высушивания, обновленная система фильтрации воздуха и наличие современных приборов контроля за процессом культивирования позволяют получать заведомо ожидаемые положительные результаты при работе на АКМ-Ш.

Заключение

Таким образом, внесенные в конструкцию биореактора изменения оптимизируют технологический этап культивирования вакцинного штамма, что позволяет стабилизировать качество вакцины по показателю жизнеспособности.

Литература

1. Безбородов А.М., Загустина Н.А., Попов В.О. Ферментативные процессы в биотехнологии. — М.: Наука, 2008. — 335 с.
2. Волох О.А., Шепелев И.А., Заднова С.П. и др. Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования штаммов холерного вибриона — продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство // Проблемы особо опасных инфекций. — Саратов, 2008. — № 1(95). — С. 52–55.
3. ГОСТ Р 51251-99. Фильтры очистки воздуха.
4. Еремин С.А., Аleshina Ю.А., Комиссаров А.В. и др. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор) // Проблемы особо опасных инфекций. — Саратов. — 2013. — № 4. — С. 95–101.
5. Еремин С.А., Волох О.А., Шепелев И.А. и др. Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляремийного микробов // Проблемы особо опасных инфекций. — Саратов. — 2006. — № 2(92). — С. 58–61.
6. Карпов А.А. Масштабирование процессов глубинного культивирования микроорганизмов в биореакторах. Дис. к.б.н. Биотехнология. — Щелково, 2004. — 122 с.
7. Коновалова Ж.А., Атлас А.Г., Дубровина В.И. Некоторые пути оптимизации процесса производства вакцины чумной живой и способы оценки ее иммуногенности // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2013. — № 2. — С. 191–196.
8. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. — М.: Медгиз, 1956. — 206 с.
9. Лещенко А.А., Туманов А.С., Шаров Д.А., и др. История создания отечественного оборудования для промышленно-

го культивирования микроорганизмов // Вестник войск РХБ защиты. — 2018. — № 1. — С. 37–47.

10. Нормативная документация НД ЛСР-005759/08-231120 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций». 2020, 21.
11. Руководство по эксплуатации и обслуживанию фармацевтического оборудования. URL: [http://www. Biotechno. ru/2016/catalog/87.html/](http://www.Biotechno.ru/2016/catalog/87.html/).
12. Селевцов Л.И. Автоматизация технологических процессов. — М.: Академия. — 2014. — 352 с.
13. Филиппов А.Ф., Алтухов М.В., Никитин Г.А. Некоторые технические усовершенствования в производстве живой чумной вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. — 1974. — № 4(38). — С. 65–67.
14. Филиппов А.Ф., Николаев Н.И., Шестеренко А.Ф., Караева Л.Т. Культивирование чумного микроба и холерного вибриона на агаре в аппаратах АКМ-Ш // Проблемы особо опасных инфекций. — 1970. — № 1(11). — С. 158–163.
15. Goren L.P., Clapp K.P. Risk and quality management — a suppliers perspective // Next Generation Pharmaceutical. — 2005. — P. 114–115.
16. Sun W., Roland K., Curtiss R. Developing live vaccines against plague // The Journal of Infection in Developing Countries. — 2011. — Vol. 5. — No. 9. — P. 614–627.
17. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: Current research and future trends // Frontiers in Immunology. — 2016. — Vol. 7. — Art. 602. doi: 10.3389/fimmu.2016.00602.

References

1. Bezborodov AM, Zagustina NA, Popov VO. Fermentativnyye protsessy v biotekhnologii. Moscow: Nauka, 2008: 335 (in Russian).
2. Volokh OA, Shepelev IA, Zadnova SP i dr. Izucheniye biokineticheskikh osobennostey i optimizatsiya usloviy kul'tivirovaniya shtammov kholernogo vibriona — produtsentov protektivnykh antigenov, perspektivnykh dlya vnedreniya v proizvodstvo. Problemy osobo opasnykh infektsiy. Saratov 2008; 1(95):52–55 (in Russian).
3. GOST R 51251-99. Fil'try ochistki vozdukha (in Russian).
4. Yeremin SA, Aleshina YuA, Komissarov AV i dr. Metody i tekhnologii kul'tivirovaniya kholernogo vibriona (obzor). Problemy osobo opasnykh infektsiy. Saratov 2013; 4:95–101 (in Russian).
5. Yeremin SA, Volokh OA, Shepelev IA i dr. Razrabotka novykh tekhnologicheskikh skhem i masshtabirovaniye protsessov polucheniya antigenov chumnogo i tulyaremiynogo mikrobov. Problemy osobo opasnykh infektsiy. Saratov 2006; 2(92):58–61 (in Russian).
6. Karpov AA. Masshtabirovaniye protsessov glubinnogo kul'tivirovaniya mikroorganizmov v bioreaktorakh. Dis kand biol nauk. Biotekhnologiya. Shchelkovo, 2004: 122 (in Russian).

7. Konovalova ZhA., Atlas AG, Dubrovina VI. Nekotoryye puti optimizatsii protsessa proizvodstva vaksiny chumnoy zhivoy i sposoby otsenki yeye immunogennosti. Byulleten' VSNTS SO RAMN 2013; 2:191–196 (in Russian).
8. Korobkova YeI. Zhivaya protivochumnaya vaksina. Moscow: Medgiz, 1956: 206 (in Russian).
9. Leshchenko AA, Tumanov AS, Sharov DA, i dr. Istoriya sozdaniya otechestvennogo oborudovaniya dlya promyshlennogo kul'tivirovaniya mikroorganizmov. Vestnik voysk RKHB zashchity 2018; 1:37–47 (in Russian).
10. Normativnaya dokumentatsiya ND LSR-005759/08-231120 «Vaksina chumnaya zhivaya, liofilizat dlya prigotovleniya suspensii dlya in'yektsiy, nakozhnogo skarifikatsionnogo naneseniya i ingyatsiy». 2020, 21 (in Russian).
11. Rukovodstvo po ekspluatatsii i obsluzhivaniyu farmatsevticheskogo oborudovaniya. URL: <http://www.Biotechno.ru/2016/catalog/87.html> (in Russian).
12. Selevtsov L.I. Avtomatizatsiya tekhnologicheskikh protsessov. Moscow: Akademiya 2014: 352 (in Russian).
13. Filippov AF, Altukhov MV, Nikitin GA. Nekotoryye tekhnicheskiye usovershenstvovaniya v proizvodstve zhivoy chumnoy vaksiny. Problemy osobo opasnykh infektsiy 1974; 4(38):65–67 (in Russian).
14. Filippov AF, Nikolayev NI, Shesterenko AF, Karayeva LT. Kul'tivirovaniye chumnogo mikroba i kholernogo vibriona na agare v apparatakh AKM-SH. Problemy osobo opasnykh infektsiy 1970; 1(11):158–163 (in Russian).
15. Goren LP, Clapp KP. Risk and quality management – a suppliers perspective. Next Generation Pharmaceutical 2005: 114–115.
16. Sun W, Roland K, Curtiss R. Developing live vaccines against plague. The Journal of Infection in Developing Countries 2011; 5(9): 614–627.
17. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: Current research and future trends. Frontiers in Immunology 2016; 7: 602. doi: 10.3389/fimmu.2016.00602.

IMPROVING THE PRODUCTION CYCLE OF LIVE PLAGUE VACCINE BY UPGRADING BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT

N.V. ABZAEVA, S.E. GOSTISCHEVA, A.V. KOSTROMINOV, M.V. PILIPENKO,
G.F. IVANOVA, A.A. FISUN, O.L. STARTSEVA, M.A. IVANOVA

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol

We modernized the construction of apparatus for the cultivation of microorganisms Shesterenko in this work. We have replaced the air filtration systems and optimized the sterilization modes of these systems. We have implemented diffuse flow testing for membrane integrity. The cultivators were equipped with aseptic membrane valves and membrane filters with CLAMP connections. We replaced the control devices with modern counterparts, which allowed us to program and analyze the cultivation process. The time for pumping agar into the fermenter has been reduced by using a peristaltic system. The design of the rocker mechanism for distributing the seed and flushing the microbial mass were simplified, since we changed the number of rotations and the duration of holding the media inside the apparatus. We carried out comparative characteristics of the quality of the obtained microbial suspension before and after simplifying the distribution mechanism. The biomass parameters met the regulated standards and don't have significant differences in both cases. Thus, the changes made to the design of the bioreactor optimize the technological stage of cultivation of the vaccine strain, which makes it possible to stabilize the quality of the vaccine in terms of viability.

Keywords: apparatus for cultivation of microorganisms, modernization, live plague vaccine, attenuated plague vaccine, biotechnology, biomass.

Address:

Gostishcheva S.E., Ph.D.

Biologist of the research and production laboratory of plague vaccines.

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol

E-mail: chumnpl@yandex.ru

Для цитирования:

Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Костроминов А.В., Пилипенко М.В., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Старцева О.Л., Иванова М.А. Усовершенствование производственного цикла вакцины чумной живой путем модернизации биотехнологического оборудования. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(2):6–12.

For citation:

Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Kostrominov A.V., Pilipenko M.V., Ivanova G.F., Fisun A.A., Startseva O.L., Ivanova M.A. Improving the production cycle of live plague vaccine by upgrading biotechnological equipment. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(2):6–12 (in Russian).

КОНСТРУИРОВАНИЕ МАГНИТНОГО ИММУНОСОРБЕНТА ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ СПОР СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

И.В. ЖАРНИКОВА, А.С. ГЕОГДЖАЯН, А.А. СЕМИРЧЕВА, Ю.Ю. ГАРКУША,
Е.В. ЖДАНОВА, С.А. КУРЧЕВА*, Д.В. РУСАНОВА, Е.Н. АФАНАСЬЕВ

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора», Ставрополь

Описана разработка магнитных иммуносорбентов (МИС) для селективного концентрирования спор сибиреязвенного микроба. Приводятся данные экспериментальных исследований по определению чувствительности и селективности магнитных иммуносорбентов (вариант постановки и учета реакции с применением иммуноферментного анализа — ИФА). В результате контрольных лабораторных испытаний установлена способность МИС прочно (на уровне реакций антиген-антитело) фиксировать на своей поверхности споры *B. anthracis*, что позволяет после осуществления отмывки пробы определить возбудителя сибирской язвы в ИФА с концентрацией $1,0 \times 10^3$ — $1,0 \times 10^4$ спор в 1 мл пробы. Это показывает, что использование сконструированных магнитных иммуносорбентов — один из перспективных методических подходов для селективного концентрирования спор при исследовании объектов окружающей среды.

Ключевые слова: сибирская язва, споровая форма, магнитные иммуносорбенты, селективное концентрирование.

Введение

Актуальность исследований по разработке технологий обнаружения и идентификации *Bacillus (B.) anthracis* определяется способностью сибиреязвенного микроба длительное время выживать в объектах окружающей среды в споровой форме, прежде всего в почве, приспосабливаясь к неблагоприятным условиям и формируя почвенные очаги. Споры обладают высокой устойчивостью к воздействию окружающей среды, включая температуру, радиацию, обычные дезинфицирующие средства и многие другие химические вещества [9]. Трудности в обнаружении и идентификации *B. anthracis* связаны с высоким фенотипическим и генетическим сходством этого вида с *Bacillus cereus* и другими близкородственными видами [16].

Индикация данного возбудителя из объектов окружающей среды (почва, корма, шерсть и др.) микро-

биологическими, молекулярно-генетическими и другими методами исследования не всегда позволяет надежно определять наличие возбудителя сибирской язвы из-за низкой концентрации спор патогена в пробе. Также образцы могут содержать другие генетически близкие виды рода *Bacillus*, широко распространенные в окружающей среде, вызывая ложноположительные реакции из-за перекрестной реактивности [12–14, 18]. Кроме того, многие иммуноанализы имеют порог чувствительности в 100–1000 раз выше расчетной инфекционной дозы, что потенциально лишает их полезности [10]. Исследование таких материалов требует наличия высокоэффективных методов селективного концентрирования искомого патогена.

Одним из перспективных методических подходов для концентрирования микроорганизмов непосредственно в исследуемом материале является применение иммуномагнитной сепарации — метода, при котором антитела, специфичные к целевому микроорганизму, иммобилизуются на магнитных сорбентах, обеспечивая эффективное концентрирование и очистку образцов от нежелательных примесей, исследуемых в последующем тестировании [8, 17] с использованием микробиологических, серологических, молекулярно-генетических и других методов [1, 3, 6, 7, 11, 15].

Цель исследования — конструирование магнитного иммуносорбента для селективного концентрирования спор сибиреязвенного микроба из объектов окружающей среды.

© 2022 г. Жарникова И.В., Геогджаян А.С., Семирчева А.А., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Афанасьев Е.Н.

* Автор для переписки:

Курчева Светлана Александровна

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций. ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: kurcheva@yandex.ru

Материалы и методы

Оценку минимальной выявляемой концентрации (чувствительности) проводили с использованием микробных культур *B. anthracis* СТИ, *B. anthracis* Sterne-34F2, *B. anthracis* 228/8. Для оценки специфичности МИС в отношении штаммов-сапрофитов использовали культуры: *B. cereus* 8035, *B. cereus* 111, *B. cereus* 8, *B. cereus* 250, *B. cereus* 104, *B. cereus* 16, *B. megaterium* 6, *B. megaterium* 2, *B. megaterium* 89, находящиеся в рабочей коллекции научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Ставропольского научно-исследовательского противочумного института. Все штаммы имели типичные морфологические, тинкториальные, культуральные свойства.

Для получения водорастворимых антигенных компонентов сибиреязвенного микроба, используемых в иммунизации, взяли методику, разработанную Е.А. Горобец [2], в которой объединены водно-солевая экстракция, ультразвуковая и механическая дезинтеграция. Для работы использовали автоклавированную (2 атм., 90 мин), проверенную на стерильность микробную массу сибиреязвенного микроба: *B. anthracis* 1 СО, предоставленную лабораторией сибирской язвы Ставропольского научно-исследовательского противочумного института.

Приготовление микробных взвесей с заданной концентрацией проводили визуально с помощью отраслевых стандартных образцов мутности (ОСО 4228-85-2021, Россия).

При работе со штаммами сибиреязвенного микроба и штаммами-сапрофитами руководствовались санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [4].

Для получения антиспоровых сывороток использовали кроликов породы «Шиншилла» весом 3,0–3,5 кг. Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н), Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Выделение IgG проводили по методу, описанному М. Steibuch и R. Andran (1969).

Для количественного определения белка в водных растворах использовали метод О. Warburg, W. Christian (1941), основанный на измерении оптической

плотности (ОП) при двух длинах волн — 280 и 260 нм. Титр специфических антител в сыворотках определяли в непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ) по Т.Н. Weller, А.Н. Coops (1954). Постановку реакции иммунодиффузии (РИД) проводили по О. Ouchterlony (1949) в чашках Петри в 1%-ном агаровом геле (Difco).

При конструировании магнитного иммуносорбента использовали сульфат железа (II) (FeSO_4) и 5%-ный раствор щелочи (KOH).

Для контроля чувствительности МИС в иммуноферментном анализе (ИФА) изготавливали экспериментальные серии иммунопероксидазного конъюгата на основе ранее полученных IgG, используя периодатное окисление фермента — пероксидазы хрена (тип VI, Rz 3,0 (Serva) с активностью 500 ед) по методу Р.К. Nakane, А.К. Kawaoi (1974). Рабочее разведение конъюгата составило 1:1000.

Результаты и обсуждение

Разработка схемы иммунизации для получения антиспоровых гипериммунных сывороток

Взяв за основу схему иммунизации, предложенную С.Н. Тюменцевым [5], при получении антиспоровой иммунной кроличьей сыворотки использовали водорастворимый антиген, детрит микробных клеток и иммунокорректор — феракрил (смесь железных (II, III) солей полиакриловой кислоты), который способен вызывать выраженное увеличение антителообразующих Т- и В-клеток.

Специфическая активность полученных гипериммунных сывороток в НРИФ достигала $1:393,84 \pm 64,32$ — $1:1772 \pm 257,28$, а в РИД — $1:15,4 \pm 1,25$ — $53,3 \pm 5,01$. При этом иммуностимулирующий эффект при отсутствии токсического воздействия на животное, без возникновения адьювантной болезни достигался у 95% кроликов. Продолжительность цикла иммунизации составляла 49–54 дня. Проверено пять экспериментальных серий гипериммунных сывороток, из них выбраны сыворотки с активностью в НРИФ — 1:1600.

Также в качестве лиганда использовали иммуноглобулины класса G с активностью в НРИФ — 1:800, выделенные из отобранных сибиреязвенных антиспоровых иммунных сывороток крови кроликов.

Получение магнитного иммуносорбента

Эффективная матрица для получения магнитного сорбента должна соответствовать ряду требований: иметь открытую и пористую структуру, частицы должны быть биологически и химически инертными, но в то же время

легко образовывать производные, обеспечивающие иммобилизацию лигандов, быть стабильными в течение определенного времени.

В результате взаимодействия сульфата железа (II) с 5%-ным раствором гидроксида калия происходит образование нерастворимого в воде основания — гидроксида железа (II), который подвергается дальнейшему прокаливанию в присутствии декстрана (6%-ный коллоидный раствор с молекулярной массой 60000 ± 10000 в 0,9%-ном растворе хлорида натрия). При нагревании полученное соединение разлагается с образованием оксида железа (II) (FeO), обладающего выраженными магнитными свойствами, коррозионной устойчивостью в жидких средах, инертностью по отношению к биологическим препаратам.

Механическое измельчение полученных магнитных сорбентов проводили методом сухого размола с использованием планетарной микромельницы «Fritsch P-7» (Германия). Охлажденную массу взвешивали по 3,0 г, помещали в размольные стаканы с мелющими шарами диаметром 10 мм из диоксида циркония. Измельчение проводили при 450 об/мин в течение 1 мин, полученные фракции объединяли. Химическое активирование поверхности полученных после измельчения образцов магнитных сорбентов проводили следующим образом. На каждые 0,4 г сорбента добавляли 3,0 мл фосфатно-солевого буфера [phosphate buffered saline] (PBS), pH 7,2 и 10 мг перйодата натрия. Инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 30 мин. По завершении времени инкубации магнитный сорбент многократно промывали PBS. В результате окислительных процессов под действием перйодата натрия на поверхности магнитных сорбентов образуются альдегидные группы, способные взаимодействовать с аминокруппами белкового лиганда.

При приготовлении МИС часть активированных на предыдущей стадии магнитных сорбентов конъюгировали с IgG с концентрацией белка 2,5 мг/мл, остальные — с гипериммунной сывороткой с концентрацией белка 12 мг/мл.

Чтобы исключить неспецифическую реакцию на иммунный комплекс Ag-Аг, были проведены исследования по блокировке свободных центров магнитной матрицы (уменьшению «фоновых помех») с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрации 0,5–1,0% в PBS. Установлено, что блокирование свободных центров связывания целесообразно проводить с использованием буферного раствора, содержащего 0,5% БСА.

При разработке технологии производства магнитных иммуносорбентов для выявления спор *B. anthracis* было изготовлено по три лабораторных серии МИС каждого типа (состав Ig и состав S).

Лабораторные испытания

Контроль чувствительности МИС проводили в экспериментах с чистыми культурами сибиреязвенного микроба гомологичных штаммов и почвенными штаммами-сапрофитами. Готовили взвеси каждого штамма с концентрациями от 1×10^9 до 1×10^2 спор в 1,0 мл. В пробирки типа Еррendorf вносили по 1,0 мл взвеси каждого из подготовленных штаммов и по 0,2 мл 10% суспензии сибиреязвенного МИС, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем тщательно отмывали 0,1 М фосфатно-солевым буфером с твин 20 (PBS-T) и вносили по 200 мкл рабочего разведения (1:1000) пероксидазного конъюгата, инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 15 минут. Промывали PBS-T не менее шести раз, используя магнитный концентратор. После этого вносили по 200 мкл тетраметилбензидина (ТМБ) и через 1–2 мин содержимое пробирок переносили в микропланшеты плоскодонные, останавливая реакцию 50 мкл стоп-реагента (4 М раствором серной кислоты). Результаты ИФА регистрировали с помощью фотометра «Multiskan FC», измеряя оптическую плотность, используя фильтр с длиной волны 450 нм. Ответ считали положительным, если оптическая плотность опытного раствора превосходила ОП контрольного (без контакта с антигеном) в два и более раза.

В таблице 1 представлены результаты определения чувствительности и селективности серий МИС при постановке ИФА. Исследования показали, что чувствительность МИС составила $1,0 \times 10^3$ – $1,0 \times 10^4$ спор/мл, а также происходило концентрирование спор некоторых взятых для проведения испытаний штаммов близкородственных бактерий (помимо *B. anthracis*). После сорбции на МИС два штамма из девяти исследованных сапрофитов дали положительный результат при концентрации спор 1×10^5 – 1×10^6 в 1 мл пробы.

На основании полученных результатов установлено, что для конструирования МИС целесообразно использовать в качестве белковой составляющей сыворотку антиспоровую (состав S). Как видно из таблицы 1, чувствительность сорбентов состава S на порядок превышает состав Ig, а также исключение такого этапа производства, как выделение иммуноглобулиновой фракции, позволит сократить временные и материальные затраты.

Результаты контроля чувствительности и селективности сибирезвездных МИС при постановке ИФА

Наименования штаммов	Отношение оптической плотности образца к отрицательному контролю						Чувствительность, спор/мл					
	состав Ig			состав S			состав Ig			состав S		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>B. anthracis</i> СТИ	2,2±0,1			2,4±0,1			1×10 ⁴			1×10 ³		
<i>B. anthracis</i> Sterne	2,3±0,1			2,7±0,1			1×10 ⁴			1×10 ³		
<i>B. anthracis</i> 228/8	2,2±0,1			2,5±0,1			1×10 ⁴			1×10 ³		
<i>B. cereus</i> 8035	1,4±0,1			1,3±0,1			—			—		
<i>B. cereus</i> 111	1,4±0,1			1,2±0,1			—			—		
<i>B. cereus</i> 8	1,3±0,1			1,1±0,1			—			—		
<i>B. cereus</i> 250	2,1±0,1			2,0±0,1			1×10 ⁶			1×10 ⁶		
<i>B. cereus</i> 104	1,5±0,1			1,4±0,1			—			—		
<i>B. cereus</i> 16	1,6±0,1			1,6±0,1			—			—		
<i>B. megaterium</i> 6	2,1±0,1			2,0±0,1			1×10 ⁶			1×10 ⁶		
<i>B. megaterium</i> 2	1,6±0,1			1,5±0,1			—			—		
<i>B. megaterium</i> 89	1,5±0,1			1,4±0,1			—			—		

Примечание: выделение полужирным шрифтом — положительные результаты (ОП опытного раствора превосходит ОП контрольного в два и более раза)

Заключение

Таким образом, отработана методика получения магнитных сибирезвездных иммуносорбентов. В результате контрольных лабораторных испытаний установлена способность МИС прочно (на уровне реакций антиген-антитело) фиксировать на своей поверхности споры *B. anthracis*, что позволяет после осуществления отмывки пробы определить возбудителя сибирской язвы в ИФА с концентрацией $1,0 \times 10^3$ — $1,0 \times 10^4$ спор в 1 мл пробы. Это показывает, что использование магнитных иммуносорбентов — один из перспективных методических подходов для селективного концентрирования спор. Дальнейшие исследования будут направлены на адаптацию сконструированных магнитных иммуносорбентов при исследовании объектов окружающей среды в качестве эффективного средства пробоподготовки.

Литература

1. Абгарян А.Г., Еременко Е.И., Ефременко В.И., Саркисова Н.В., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н., Жданова Е.В. Способ индикации возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды. Патент РФ 2223499. Оpubл. 10.02.2004, Бюл. № 4. — 5 с.
2. Горобец Е.А. Разработка иммунобиологических препаратов для диагностики сибирской язвы: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ставрополь, 2009. — 19 с.
3. Левченко Н.В., Ефременко В.И. Экспресс-диагностика вируса гриппа птиц в объектах окружающей среды, содержащих патоген в низких концентрациях // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2011. — № 1. — С. 46—49.
4. СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
5. Тюменцев С.Н., Анреевская Н.М., Тюменцева И.С., Калиновский А.И., Репина Л.П., Загоскина Т.Ю. Способ получения диагностической сыворотки. Патент РФ 2010577. Оpubл. 15.04.1994. — 4 с.
6. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ляпустина Л.В., Козоткова О.И., Жарникова И.В., Ефременко В.И., Будыка Д.А., Василенко Н.Ф., Афанасьева Е.Е., Куличенко А.Н. Иммуномагнитные сорбенты для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний: аспекты биотехнологии и опыт применения // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 3(101). — С. 59—61.
7. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Савельева И.В., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Курчева С.А., Старцева О.Л., Куличенко А.Н. Разработка тест-систем магнитоиммуносорбентных для выявления холерного вибриона в объектах окружающей среды // Здоровье населения и среда обитания. Ежемесячный информационный бюллетень. — 2014. — № 4(253). — С. 17—19.
8. Alexiou C., Jurgons R., Seligtr C., Iro H. Medical applications of magnetic nanoparticles // J. Nanosci. Nanotechnol. — 2006. — Vol. 6(9—10). — P. 2762—2768.
9. Dauphin L.A., Moser B.D., Bowen M.D. Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples // J. Microbiol. Methods. — 2009. — Vol. 76. — P. 30—37.
10. Franz D.R., Jahrling P.B., McClain D.J., Hoover D.L., Byrne W.R., Paulin J.A., Christopher G.W., Cieslak T.J., Friedlander A.M., Eitzen E.M. Jr. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents // Clin. Lab. Med. — 2001. — Vol. 21. — P. 435—473.

11. Gijs M.A. Magnetic particle handling microsystems for miniaturized analytical applications // Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. – 2007. – P. 4088–4089.
12. Hoffmaster A.R., Hill K.K., Gee J.E., Marston C.K., De B.K., Popovic T., Sue D., Wilkins P.P., Avashia S.B., Drumgoole R., Helma C.H., Ticknor L.O., Okinaka R.T., Jackson P.J. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: Strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 3352–3360.
13. Hoffmaster A.R., Ravel J., Rasko D.A., Chapman G.D., Chute M.D., Marston C.K., De B.K., Sacchi C.T., Fitzgerald C., Mayer L.W., Maiden M.C., Priest F.G., Barker M., Jiang L., Cer R.Z., Rilstone J., Peterson S.N., Weyant R.S., Galloway D.R., Read T.D., Popovic T., Fraser C.M. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 8449–8454.
14. Klee S.R., Brzuszkiewicz E.B., Nattermann H., Brüggemann H., Dupke S., Wollherr A., Franz T., Pauli G., Appel B., Liebl W., Couacy-Hymann E., Boesch C., Meyer F.D., Leendertz F.H., Ellerbrok H., Gottschalk G., Grunow R., Liesegang H. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. – e10986. doi: 10.1371/journal.pone.0010986.
15. Peruski A.H., Peruski L.F. Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2003. – Vol. 10(4). – P. 506–513.
16. Rao Sh.S., Mohan K.V.K., Atreya Ch.D. Detection technologies for *Bacillus anthracis*: Prospects and challenges // Journal of Microbiological Methods. – 2010. – Vol. 82. – P. 1–10. doi: 10.1016/j.mimet.2010.04.005.
17. Waller D.F., Hew B.E., Holdaway C., Jen M., Peckham G.D. Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using immunomagnetic separation and amperometry // Biosensors. – 2016. – Vol. 6(4). – Art. 61. doi: 10.3390/bios6040061.
18. Zasada A.A. Detection and identification of *Bacillus anthracis*: From conventional to molecular microbiology methods // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8(1). – Art. 125. doi: 10.3390/microorganisms8010125.
19. vneshney sredy. Patent RF 2223499. Opubl 10.02.2004, Byul 4: 5 (in Russian).
20. Gorobets YeA. Razrabotka immunobiologicheskikh preparatov dlya diagnostiki sibiirskoy yazvy: avtoref dis ... kand biol nauk. Stavropol', 2009: 19 (in Russian).
21. Levchenko NV, Yefremenko VI. Ekspress-diagnostika virusa grippa ptits v ob'yektakh okruzhayushchey sredy, sodержashchikh patogen v nizkikh kontsentratsiyakh. Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza 2011; 1:46–49 (in Russian).
22. SanPin 3.3686-21 «Sanitarno-epidemiologicheskkiye trebovaniya po profilaktike infektsionnykh bolezney» (in Russian).
23. Tyumentsev SN, Anreyevskaya NM, Tyumentseva IS, Kalinovskiy AI, Repina LP, Zagoskina TYu. Sposob polucheniya diagnosticheskoy syvorotki. Patent RF 2010577. Opubl 15.04.1994: 4 (in Russian).
24. Tyumentseva IS, Afanas'yev YeN, Lyapustina LV, Kogotkova OI, Zharnikova IV, Yefremenko VI, Budyka DA, Vasilenko NF, Afanas'yeva YeYe, Kulichenko AN. Immunomagnitnyye sorbenty dlya ekspress-diagnostiki opasnykh infektsionnykh zabolevaniy: aspekty biotekhnologii i opyt primeneniya. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2009; 3(101):59–61 (in Russian).
25. Tyumentseva IS, Afanas'yev YeN, Savel'yeva IV, Zharnikova IV, Zhdanova YeV, Kurcheva SA, Startseva OL, Kulichenko AN. Razrabotka test-sistem magnoimmunosorbentnykh dlya vyyavleniya kholernogo vibriona v ob'yektakh okruzhayushchey sredy. Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya. Yezhemesyachnyy informatsionnyy byulleten' 2014; 4(253):17–19 (in Russian).
26. Alexiou C, Jurgons R, Seligtr C, Iro H. Medical applications of magnetic nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol 2006; 6(9–10):2762–2768.
27. Dauphin LA, Moser BD, Bowen MD. Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. J Microbiol Methods 2009; 76:30–37.
28. Franz DR, Jahrling PB, McClain DJ, Hoover DL, Byrne WR, Pavlin JA, Christopher GW, Cieslak TJ, Friedlander AM, Eitzen EM Jr. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. Clin Lab Med 2001; 21:435–473.
29. Gijs MA. Magnetic particle handling microsystems for miniaturized analytical applications. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc 2007:4088–4089.
30. Hoffmaster AR, Hill KK, Gee JE, Marston CK, De BK, Popovic T, Sue D, Wilkins PP, Avashia SB, Drumgoole R, Helma CH, Ticknor LO, Okinaka RT, Jackson PJ. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: Strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. J Clin Microbiol 2006; 44:3352–3360.

References

1. Abgaryan AG, Yereimenko YeI, Yefremenko VI, Sarkisova NV, Zharnikova IV, Afanas'yev YeN, Zhdanova YeV. Sposob indikatsii vzbuditelya sibirskoy yazvy v ob'yektakh

13. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, De BK, Sacchi CT, Fitzgerald C, Mayer LW, Maiden MC, Priest FG, Barker M, Jiang L, Cer RZ, Rilstone J, Peterson SN, Weyant RS, Galloway DR, Read TD, Popovic T, Fraser CM. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:8449–8454.
14. Klee SR, Brzuszkiewicz EB, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, Franz T, Pauli G, Appel B, Liebl W, Couacy-Hymann E, Boesch C, Meyer FD, Leendertz FH, Ellerbrok H, Gottschalk G, Grunow R, Liesegang H. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS ONE* 2010; 5:e10986. doi: 10.1371/journal.pone.0010986.
15. Peruski AH, Peruski LF Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(4):506–513.
16. Rao ShS, Mohan KVK., Atreya ChD. Detection technologies for *Bacillus anthracis*: Prospects and challenges. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 82:1–10. doi: 10.1016/j.mimet.2010.04.005.
17. Waller DF, Hew BE, Holdaway C, Jen M, Peckham GD. Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using immunomagnetic separation and amperometry. *Biosensors* 2016; 6(4):61. doi: 10.3390/bios6040061.
18. Zasada AA. Detection and identification of *Bacillus anthracis*: From conventional to molecular microbiology methods. *Microorganisms* 2020; 8(1):125. doi: 10.3390/microorganisms8010125.

CONSTRUCTION OF A MAGNETIC IMMUNOSORBENT FOR THE SELECTIVE CONCENTRATION OF ANTHRAX MICROBE SPORES

I.V. ZHARNIKOVA, A.S. GEOGJAYAN, A.A. SEMIRCHEVA, Yu.Yu. GARKUSHA,
E.V. ZHDANOVA, S.A. KURCHEVA, D.V. RUSANOVA, E.N. AFANASIEV

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol

The development of magnetic immunosorbents (MIS) for selective concentration of anthrax microbe spores is described. The data of experimental studies to determine the sensitivity and selectivity of magnetic immunosorbents are presented (a variant of the formulation and accounting of the reaction using enzyme immunoassay — ELISA). As a result of control laboratory tests, the ability of the MIS to firmly (at the level of antigen-antibody reactions) fix B spores on its surface was established. This allows, after washing the sample, to determine the causative agent of anthrax in ELISA with a concentration of 1.0×10^3 – 1.0×10^4 spores in 1 ml of the sample. This indicates that the use of the designed magniimmunosorbents is one of the promising methodological approaches for the selective concentration of spores in the study of environmental objects.

Keywords: anthrax, spore form, magnetic immunosorbent, selective concentration.

Address:

Kurcheva S.A., Ph.D.

Leading researcher of the research and production laboratory of preparations for the diagnosis of particularly dangerous and other infections. Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: kurcheva@yandex.ru

Для цитирования:

Жарникова И.В., Геогджаян А.С., Семирчева А.А., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Афанасьев Е.Н. Конструирование магнитного иммуносорбента для селективного концентрирования спор сибиреязвенного микроба. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2022; 18(2):13–18.

For citation:

Zharnikova I.V., Geogjayan A.S., Semircheva A.A., Garkusha Yu.Yu., Zhdanova E.V., Kurcheva S.A., Rusanova D.V., Afanasiev E.N. Construction of a magnetic immunosorbent for the selective concentration of anthrax microbe spores. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(2):13–18 (in Russian).

БЕЗМЕМБРАННЫЙ МИКРОБНЫЙ БИОТОПЛИВНЫЙ ЭЛЕМЕНТ, РАБОТАЮЩИЙ НА ДОЖДЕВЫХ СТОЧНЫХ ВОДАХ

Д.А. ХАРЬКОВ¹, М.П. ЖИЯНОВА², М.В. ВИШНЕВСКАЯ^{3*}

¹ ФГАОУ ВО «Московский политехнический университет»,

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

³ НИЦ «Курчатовский институт», Москва

В настоящее время значительное внимание уделяется созданию малоомощных источников энергии, которые могли бы использоваться для электроснабжения различных распределенных сенсорных сетей, а также для подзарядки робототехнических систем. Микробные топливные элементы рассматриваются как один из наиболее перспективных подобных источников энергии, в случае если вся система работает в средах, где присутствует жидкость с органическими примесями, такими как поверхностные или сточные воды. В данной работе показано, что безмембранный микробный биотопливный элемент может стабильно работать в течение 35 дней и при этом генерировать мощность до 19 мВт/м² в последний день работы. За счет последовательного соединения ячеек удалось обеспечить выходное напряжение, достаточное для работы большинства современных микроомощных устройств и систем сбора и управления выдчей электрической мощности. Такие устройства могут стать перспективным источником энергии для распределенных сенсоров или для подзарядки аккумуляторов, работающих в водных средах робототехнических систем.

Ключевые слова: микробный топливный элемент, биопленка, графитированная ткань, биоэнергетика.

Введение

Сегодня значительное внимание уделяется микроомощным источникам энергии, которые могли бы использоваться для различных распределенных электронных устройств. Такой интерес обусловлен развитием концепции интернета вещей в рамках поселения, сельскохозяйственного предприятия и даже крупного города [3, 10]. В рамках данной концепции большое количество разнообразных сенсоров распределены по большой площади и взаимодействуют между собой и с общей системой с использованием низкоомощных радиосистем [5]. Для подобных сенсоров требуются независимые источники энергии, так как подключение их к общей сети зачастую невозможно либо дорого [20, 21]. Среди различных потенциальных источников энергии микробные биотопливные элементы рассматриваются как наиболее перспективные для автономных робототехнических систем [4, 7] и для распределенных сенсоров, контролирующих состояние окружающей среды [5].

Ключевым ограничением для широкого использования микробных биотопливных элементов является высокая стоимость протонопроводящей мембраны, разделяющей анодную и катодную камеры [13]. Для решения этой проблемы рассматриваются различные подходы: среди них следует отметить безмембранные ячейки, которые могут генерировать достаточно энергии для их практического применения [1, 17]. Очевидно, что исключение мембраны приводит к значительному снижению мощности биотопливного элемента, однако при их массовом применении стоимость самого устройства и генерируемого им электричества становится существенно ниже [6]. Следовательно, недорогой безмембранный микробный биотопливный элемент мог бы рассматриваться в качестве перспективного источника энергии для распределенных сенсорных устройств городского интернета вещей. В работе [15] показана возможность использования микробного биотопливного элемента для обеспечения работы беспроводного сенсора и передачи сигнала с достаточной для такого типа сенсоров периодичностью через Low-Power Bluetooth на смартфон. В качестве биокатализатора использовались бактерии *Glucobacter oxydans*, которые являются одними из наиболее распространенных электрогенных бактерий, используемых в биотопливных элементах [8, 14]. Нужно подчеркнуть, что дождевая вода, текущая по уличным

© 2022 г. Харьков Д.А., Жиянова М.П., Вишневская М.В.

* Автор для переписки:

Вишневская Мария Владиславовна
младший научный сотрудник, отдел биотехнологии и биоэнергетики,
НИЦ «Курчатовский институт»,
E-mail: Vishnevskaya_MV@nrcki.ru

водосборным коллекторам, как правило, уже содержит в себе органические примеси и может использоваться в качестве субстрата для работы небольших биотопливных элементов [1, 2, 11].

Помимо распределенных сенсорных сетей, микробные биотопливные элементы, способные работать на органических примесях, содержащихся в поверхностных водах, интересны и в качестве источника энергии для автономных мобильных роботов [4, 16]. При этом биотопливные элементы выступают как основной источник энергии для маломобильных роботов [19, 12], так и в качестве дополнительного источника подзарядки, продляющего длительность автономной работы робота [4].

Таким образом, сейчас появляется интерес к использованию микробных биотопливных элементов, использующих в качестве субстрата органические примеси в поверхностных сточных водах. Однако к настоящему времени не рассматривалась достаточно широко возможность использования естественного микробного биоценоза поверхностных дождевых сточных вод. В настоящей работе показаны возможность выращивания естественного микробного биоценоза дождевых вод на электроде и работа микробного биотопливного элемента в безмембранном режиме.

Материалы и методы

Дождевые сточные воды собирались в Северо-Западном округе города Москвы (координаты 55,8057812 и 37,4737899).

Подготовка анода проводилась следующим образом: графитированная ткань ТГН-2МК (НИИ Графит, Россия) пропитывалась в растворе, имитирующем сточные воды в течение часа. Состав раствора: 1000 мг/л глюкозы, 95,5 мг/л NH_4Cl , 56,3 мг/л мочевины, 22,6 мг/л KH_2PO_4 , 12,6 мг/л $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 309 мг/л NaHCO_3 и 35 мг/л дрожжевого экстракта [17]. Далее электрод помещался в дождевые сточные воды на семь суток для образования на нем биопленки.

Измерения показателей микробного топливного элемента проводились на потенциостате Metrohm Autolab PGSTAT204, осуществлялась вольтамперометрия с линейной разверткой и циклическая вольтамперометрия. После окончания измерений анод снова погружался в емкость с поверхностными сточными водами до следующего измерения. Катод хранился насухо в чашке Петри при комнатной температуре. Все исследования проводились в течение месяца.

В качестве испытательного стенда использовалась стеклянная емкость объемом 100 мл с опущенными в нее электродами, закрепленными стандартными электрохимическими зажимами.

Электрическая мощность ячейки рассчитывалась по следующей формуле:

$$P=I \times U,$$

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

Для эксперимента с повышением выходного напряжения использовались пять последовательно соединенных ячеек биотопливных элементов.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены вольтамперограммы микробного биотопливного элемента в разные дни. Значения удельной электрической мощности по дням приведены в таблице 1. Из представленных данных видно, что максимальная мощность БТЭ была достигнута в первый день и в дальнейшем снизилась, стабилизировавшись к концу эксперимента примерно на уровне 20 мВт/м². Данный эффект виден и на циклической вольтамперограмме — емкость ячейки, которая определяется площадью внутри циклической характеристики, в первый день существенно выше, чем в остальные дни. Причиной такого падения мощности является, видимо, перестройка биопленки и ее уменьшение при работе электрода. В первый день электрод насыщен органическими соединениями и богатой средой, имитирующей сточные воды, по мере расходования которых сокращалась и биопленка до состояния, жизнеспособного при рабочих средах.

Следует отметить, что в течение 35 дней эксперимента электрод показывал стабильную работу, демонстрируя электрическую мощность от 14,18 до 22,91 мВт/м², за исключением третьего дня. Таких мощностей достаточно для снабжения маломощных сенсоров и подзарядки аккумуляторов робототехнических систем.

Выходное напряжение на одной ячейке биотопливного элемента составляло от 88 до 132 мВ. При последовательном соединении пяти ячеек, проработавших по 35 дней каждая, удалось достичь выходного напряжения в 546 мВ, что достаточно для работы большинства современных микроощных устройств, а также систем управления выдачей электрической мощности от маломощных источников [18, 19].

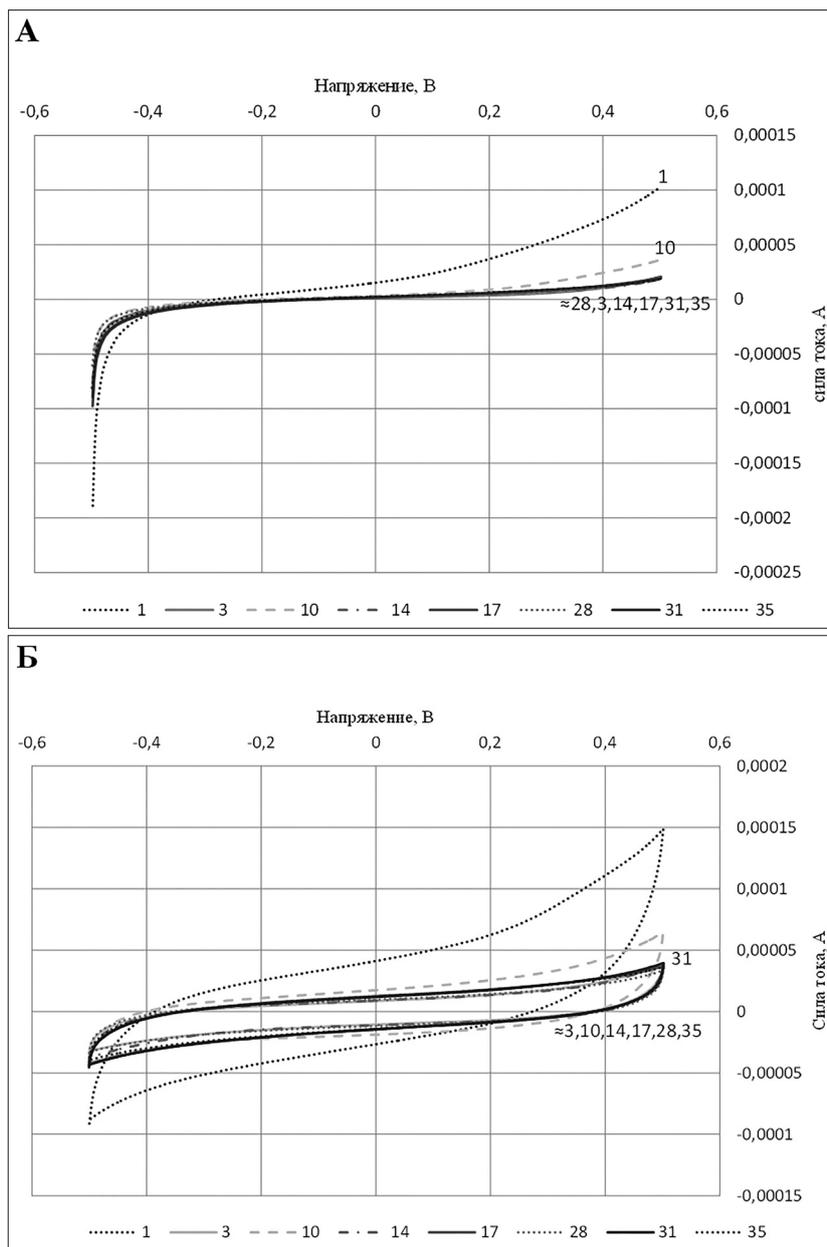


Рис. 1. Вольтамперограммы микробного биотопливного элемента. А — линейная; Б — циклическая

Таблица 1

Удельная мощность биотопливного элемента

Срок жизни электрода	Удельная мощность, мВт/м ²
0	44,19
3	11,06
10	19,33
14	14,18
17	17,45
28	22,91
31	20,96
35	19,03

Таким образом, показано, что безмембранный микробный биотопливный элемент может стабильно работать в течение 35 дней и при этом генерировать мощность до 19 мВт/м² в последний день работы. За счет последовательного соединения ячеек удалось обеспечить выходное напряжение, достаточное для работы большинства современных микроощных устройств и систем сбора и управления выдачей электрической мощности. Такие устройства могут стать перспективным источником энергии для распределенных сенсоров или для подзарядки аккумуляторов, работающих в водных средах робототехнических систем.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение динамики изменения биопленки на аноде в процессе длительной работы биотопливного элемента.

Работа выполнена в рамках финансирования в соответствии с приказом 2754 от 28.10.2021.

Литература

1. Amen M.T. et al. Rainwater-driven microbial fuel cells for power generation in remote areas // R. Soc. Open Sci. The Royal Society. — 2021. — Vol. 8. — No. 11. — Art. 210996. doi: 10.1098/rsos.210996.
2. Chu N. et al. Microbial electrochemical sensor for water biotoxicity monitoring // Chemical Engineering Journal. — 2021. — Vol. 404. — Art. 127053. doi: 10.1016/j.cej.2020.127053.
3. Galle N.J., Nitoslawski S.A., Pilla F. The Internet of nature: How taking nature online can shape urban ecosystems // The Anthropocene Review. — 2019. — Vol. 6. — No. 3. — P. 279–287.
4. Gotovtsev P. et al. Bioenergy based power sources for mobile autonomous robots // Robotics. — 2018. — Vol. 7. — No. 2. — P. 2–18.
5. Gotovtsev P. How IoT can integrate biotechnological approaches for city applications — Review of recent advancements, issues, and perspectives // Appl. Sci. — 2020. — Vol. 10. — No. 11. — Art. 3990. doi: 10.3390/app10113990.
6. Gotovtsev P.M., Dyakov A.V. Biotechnology and Internet of Things for green smart city application // 2016 IEEE 3rd World Forum on Internet of Things (WF-IoT). IEEE, 2016. — P. 542–546.
7. Greenman J., Mendis A., You J., Gajda I., Horsfield I., Ieropoulos I. Microbial fuel cell based thermosensor for robotic applications // Frontiers in robotics and AI. — 2021. — Vol. 8. — Art. 558953. doi: 10.3389/frobt.2021.558953.
8. Hua X. et al. Reinforcing sorbitol bio-oxidative conversion with *Gluconobacter oxydans* whole-cell catalysis by acetate-assistance // Biochem. Eng. J. — 2022. — Vol. 179. — Art. 108328. doi: 10.1016/j.bej.2021.108328.
9. Li G., Chen X., Zhou F., et al. Self-powered soft robot in the Mariana Trench // Nature. — 2021. — Vol. 591. — No. 7848. — P. 66–71.
10. Luger J. Re-envisioning the global city's future // City. — 2019. — Vol. 23(4–5). — P. 676–680.
11. Olias L.G., Di Lorenzo M. Microbial fuel cells for in-field water quality monitoring // RSC Adv. — 2021. — Vol. 11. — No. 27. — P. 16307–16317.
12. Philamore H. et al. Row-bot an energetically autonomous artificial water boatman // 2015 IEEE/RSJ Int. Conf. Intell. Robot. Syst. IROS, 2015. — P. 3888–3893.
13. Reimers C.E. et al. Benthic microbial fuel cell systems for marine applications // J. Power Sources. — 2022. — Vol. 522. — No. 22. — Art. 231033. doi: 10.1016/j.jpowsour.2022.231033.
14. Reshetilov A.N. et al. Effect of some carbon nanomaterials on ethanol oxidation by *Gluconobacter oxydans* bacterial cells // Appl. Biochem. Microbiol. — 2017. — Vol. 53. — No. 1. — P. 123–129.
15. Somov A. et al. Bacteria to power the smart sensor applications: Biofuel cell for low-power IoT devices // 2018 IEEE 4th World Forum on Internet of Things (WF-IoT). IEEE, 2018. — P. 802–806.
16. Tsompanas M.-A. et al. Neural networks predicting microbial fuel cells output for soft robotics applications // Front. Robot. AI. — 2021. — Vol. 8. — Art. 633414. doi: 10.3389/frobt.2021.633414.
17. Vishnevskaya M. et al. Membraneless microbial biofuel cell for municipal waste water treatment // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. — 2019. — Vol. 337. — Art. 012002. doi: 10.1088/1755-1315/337/1/012002.
18. Vostrikov S., Somov A., Gotovtsev P. Low temperature gradient thermoelectric generator: Modelling and experimental verification // Appl. Energy. — 2019. — Vol. 255. — Art. 113786. doi: 10.1016/j.apenergy.2019.113786.
19. Vostrikov S. et al. Comprehensive modelling framework for a low temperature gradient thermoelectric generator // Energy Convers. Manag. — 2021. — Vol. 247. — Art. 114721. doi: 10.1016/j.enconman.2021.114721.
20. Zanella A. et al. Internet of things for smart cities // IEEE Internet Things J. — 2014. — Vol. 1. — Issue 1. — P. 22–32.
21. Zhu C. et al. Green Internet of Things for Smart World // IEEE Access. — 2015. — Vol. 3. — P. 2151–2162.

References

1. Amen M.T. et al. Rainwater-driven microbial fuel cells for power generation in remote areas // R. Soc. Open Sci. The Royal Society. — 2021. — Vol. 8. — No. 11. — Art. 210996. doi: 10.1098/rsos.210996.
2. Chu N. et al. Microbial electrochemical sensor for water biotoxicity monitoring // Chemical Engineering Journal. — 2021. — Vol. 404. — Art. 127053. doi: 10.1016/j.cej.2020.127053.

3. Galle N.J., Nitoslawski S.A., Pilla F. The Internet of Nature: How taking nature online can shape urban ecosystems // *The Anthropocene Review*. – 2019. – Vol. 6. – No. 3. – P. 279–287.
4. Gotovtsev P. et al. Bioenergy based power sources for mobile autonomous robots // *Robotics*. – 2018. – Vol. 7. – No. 2. – P. 2–18.
5. Gotovtsev P. How IoT can integrate biotechnological approaches for city applications – Review of recent advancements, issues, and perspectives // *Appl. Sci*. – 2020. – Vol. 10. – No. 11. – Art. 3990. doi: 10.3390/app10113990.
6. Gotovtsev P.M., Dyakov A.V. Biotechnology and Internet of Things for green smart city application // 2016 IEEE 3rd World Forum on Internet of Things (WF-IoT). IEEE, 2016. – P. 542–546.
7. Greenman J., Mendis A., You J., Gajda I., Horsfield I., Ieropoulos I. Microbial fuel cell based thermosensor for robotic applications // *Frontiers in robotics and AI*. – 2021. – Vol. 8. – Art. 558953. doi: 10.3389/frobt.2021.558953.
8. Hua X. et al. Reinforcing sorbitol bio-oxidative conversion with *Gluconobacter oxydans* whole-cell catalysis by acetate-assistance // *Biochem. Eng. J.* – 2022. – Vol. 179. – Art. 108328. doi: 10.1016/j.bej.2021.108328.
9. Li G., Chen X., Zhou F., et al. Self-powered soft robot in the Mariana Trench // *Nature*. – 2021. – Vol. 591. – No. 7848. – P. 66–71.
10. Luger J. Re-envisioning the global city's future // *City*. – 2019. – Vol. 23(4–5). – P. 676–680.
11. Olias L.G., Di Lorenzo M. Microbial fuel cells for in-field water quality monitoring // *RSC Adv*. – 2021. – Vol. 11. – No. 27. – P. 16307–16317.
12. Philamore H. et al. Row-bot an energetically autonomous artificial water boatman // 2015 IEEE/RSJ Int. Conf. Intell. Robot. Syst. IROS, 2015. – P. 3888–3893.
13. Reimers C.E. et al. Benthic microbial fuel cell systems for marine applications // *J. Power Sources*. – 2022. – Vol. 522. – No. 22. – Art. 231033. doi: 10.1016/j.jpowsour.2022.231033.
14. Reshetilov A.N. et al. Effect of some carbon nanomaterials on ethanol oxidation by *Gluconobacter oxydans* bacterial cells // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2017. – Vol. 53. – No. 1. – P. 123–129.
15. Somov A. et al. Bacteria to power the smart sensor applications: Biofuel cell for low-power IoT devices // 2018 IEEE 4th World Forum on Internet of Things (WF-IoT). IEEE, 2018. – P. 802–806.
16. Tsompanas M.-A. et al. Neural networks predicting microbial fuel cells output for soft robotics applications // *Front. Robot. AI*. – 2021. – Vol. 8. – Art. 633414. doi: 10.3389/frobt.2021.633414.
17. Vishnevskaya M. et al. Membraneless microbial biofuel cell for municipal waste water treatment // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2019. – Vol. 337. – Art. 012002. doi: 10.1088/1755-1315/337/1/012002.
18. Vostrikov S., Somov A., Gotovtsev P. Low temperature gradient thermoelectric generator: Modelling and experimental verification // *Appl. Energy*. – 2019. – Vol. 255. – Art. 113786. doi: 10.1016/j.apenergy.2019.113786.
19. Vostrikov S. et al. Comprehensive modelling framework for a low temperature gradient thermoelectric generator // *Energy Convers. Manag.* – 2021. – Vol. 247. – Art. 114721. doi: 10.1016/j.enconman.2021.114721.
20. Zanella A. et al. Internet of things for smart cities // *IEEE Internet Things J.* – 2014. – Vol. 1. – Issue 1. – P. 22–32.
21. Zhu C. et al. Green Internet of Things for Smart World // *IEEE Access*. – 2015. – Vol. 3. – P. 2151–2162.

MEMBRANELESS MICROBIAL BIOFUEL CELL POWERED BY RAINWATER

D.A. KHARKOV¹, M.P. ZHIYANOVA², M.V. VISHNEVSKAYA³

¹ *Moscow Polytechnic University,*

² *Lomonosov Moscow State University,*

³ *NRC «Kurchatov Institute», Moscow*

Today significant attention turn on the development of the low-power energy harvesting systems that can be used as a power sources for the different sensors networks and for recharge of robotics systems. Microbial fuel cells discussing as a most perspective energy source for systems and devices operating with contact of organic impurities containing water like surface water and wastewater. In this work it is shown that mimbranless microbial fuel cell can demonstrate a stable operation during 35 days with power output equal to 19 mW/m² in the last day of experiment. Then biofuel cells connected in series, output voltage became enough for power supply of the number of the modern low-power devices and energy harvesters. Such systems can be perspective power sources for sensors networks and water-operating robots batteries recharge.

Keywords: microbial fuel cell, biofilm, graphite cloth, bioenergy.

Address:

Vishnevskaya M.V.
Junior Researcher, Department of Biotechnology and Bioenergy,
National Research Centre «Kurchatov Institute»
E-mail: Vishnevskaya_MV@nrcki.ru

Для цитирования:

Харьков Д.А., Жиянова М.П., Вишневская М.В. Безмембранный микробный биотопливный элемент, работающий на дождевых сточных водах. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(2):19–24.

For citation:

Kharkov D.A., Zhiyanova M.P., Vishnevskaya M.V. Membraneless microbial biofuel cell powered by rainwater. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(2):19–24 (in Russian).

ПОЛИСЦЕНАРНАЯ КОНЦЕПЦИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВА В СФЕРЕ ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ: СТИМУЛИРОВАНИЕ, БЕЗОПАСНОСТЬ И УСТРАНЕНИЕ МЕЖОТРАСЛЕВЫХ ПРАВОВЫХ ПРОТИВОРЕЧИЙ

Ю.А. ПЕТУШКОВА*, П.А. КАМЕНСКИЙ

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Статья посвящена разработке концепции совершенствования законодательства в сфере геномных технологий. Определены критерии для выявления основных противоречий между отраслями права и выявлены коллизии в административном, экологическом и информационном праве. Обоснованы сценарии развития законодательства в сфере генетических технологий в условиях принятых государственных стратегий и программ. Применен SWOT-анализ основных сценариев совершенствования законодательства как инструмент оценки стратегического планирования в праве. Проведена оценка реализации различных моделей правового регулирования в Российской Федерации.

Ключевые слова: геномные технологии, SWOT-анализ, межотраслевые правовые коллизии.

Введение

Развитие и внедрение геномных технологий обозначено на государственном уровне как важнейшая задача обеспечения технологической независимости в направлениях здравоохранения, сельского хозяйства и промышленности в соответствии с целями Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на период 2019–2027 годы [5].

Однако никакая программа не является устанавливающей нормы правовым актом и, как и любой политический документ, несет исключительно стратегический характер. При этом в соответствии с ФЗ «О стратегическом планировании в Российской Федерации» Государственные программы утверждаются Правительством РФ в соответствии с Бюджетным кодексом, то есть их принятие предусматривает финансовое обеспечение, а их исполнение контролируются также на правительственном уровне [11].

При этом для достижения целевых показателей Программы развития генетических технологий, в частности, по разработке новых линий сельскохозяйственных культур, быстрорастущих линий деревьев, линий сельскохозяйственных животных, устойчивых к вирусным

заболеваниям, в том числе с использованием технологий генетического редактирования, необходимы правовые условия для их разработки и выращивания. Наряду с этим, программа планирует создание национальных биоресурсных центров, которые функционально готовы к работе, однако в процессе деятельности могут столкнуться с проблемами, связанными с пробелами в регулировании правоотношений в части передачи биоматериала и передачи прав на его использование. Наконец, направление здравоохранения открывает огромный нерешенный пласт правовых проблем, связанных с правовым статусом генетической информации.

Реализация показателей программы возможна только при выполнении двух условий: разработки стимулирующих правовых норм, позволяющих эффективное и безопасное внедрение генетических технологий, с одной стороны, и соблюдение баланса принципов, подходов и целей правового регулирования во всех отраслях права, с другой. В связи с тем, что генетические технологии входят в предмет различных отраслей права, практически невозможно обеспечить единство правового регулирования в условиях несоответствия методов и подходов между отраслями.

Таким образом, любые самостоятельные предложения по изменению законодательства в сфере генетических технологий потенциально вносят коллизии между отраслями права. Для решения этой проблемы предложена полисценарная концепция совершенствования законодательства в сфере генетических технологий.

© 2022 г. Петушкова Ю.А., Каменский П.А.

* **Автор для переписки:**

Петушкова Юлия Алексеевна

канд. биол. наук, ст.н.с. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

E-mail: jupponline@gmail.com

Целью исследования была разработка концепции совершенствования законодательства в сфере геномных технологий, обеспечивающей баланс между публичными отраслями права и ориентированной на безопасное использование таких технологий.

В задачи исследования входило:

1. Определение критериев, по которым определяются потенциальные коллизии в публичных отраслях права в сфере генетических технологий.
2. Выявление основных коллизий в публичных отраслях права на основании выработанных критериев.
3. Определение сценариев совершенствования законодательства с учетом анализа открывающихся окон возможностей, ограничения перспектив, а также потенциальных проблем и рисков для каждого из сценариев.
4. SWOT-анализ предпочтительных сценариев совершенствования законодательства в сфере генетических технологий.
5. Описание административно-правовых моделей правового регулирования генетических технологий и оценка их реализации.

Материалы и методы

Авторами применялся комплекс экспертно-аналитических методов, общепринятых в социальных и гуманитарных науках (включая юриспруденцию). Для более глубокой разработки отдельных проблем законодательства и правоприменения использовался SWOT-анализ [1, 7], являющийся методом стратегического планирования с оценкой сильных и слабых сторон действий при реализации достижения намеченной цели (с обращением внимания на возникающие при этом возможности и риски).

Результаты

I. Критерии определения потенциальных коллизий в публичных отраслях права в сфере генетических технологий

Коллизии в праве возникают вследствие разных позиций в праве относительно тех же правоотношений. Учеными отмечены основные причины их возникновения, в том числе чрезмерная новеллизация и модернизация законодательства, недостаточно высокий уровень правотворческой работы. Отсутствие легитимного определения коллизий дополнительно усугубляет проблему, в связи с чем предполагалось ввести его в проект закона о норма-

тивных правовых актах и определить как «различия или противоречия между юридическими нормами, претендующими на регулирование одной и той же фактической ситуации» [2]. В качестве основных публичных отраслей права, регулирующих в сфере генетических технологий и входящих в основу полисценарной концепции, определены следующие отрасли: административное право, экологическое право и информационное право. Именно данные отрасли несут наибольшие риски противоречий и требуют гармонизации в сфере генетических технологий. Совершенствование в остальных отраслях, включая международное, уголовное и налоговое право, предполагает последующий выбор модели административно-правового регулирования, причем каждая модель может быть построена при любом из предложенных сценариев.

В качестве основных критериев выявления коллизий в данном исследовании определены: а) цели правового регулирования согласно правовым нормам отрасли, б) проблемы правового регулирования генетических технологий в рассматриваемой отрасли, в) инструменты правового регулирования, г) принципы, принятые в отрасли.

II. Выявление основных коллизий в публичных отраслях права на основании выработанных критериев

В случае противоречия какого-либо из представленных критериев одной отрасли любому критерию другой отрасли возникает коллизия в праве. В ходе исследования выявлено несколько примеров.

1. *Цели административного права вступают в противоречие с инструментом правового регулирования в экологическом праве.* Так, административное право предполагает повышение эффективности сельского хозяйства, улучшение условий жизни человека и охрану его здоровья, а также повышение эффективности сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности, равно как и охрану и восстановление окружающей среды и сохранение биоразнообразия. В пользу этого аргумента свидетельствуют нормы статьи 5 Федерального закона «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» [12]. Вместе с тем способ, принятый в экологической отрасли права, предусматривает запрет применения генетических технологий. Это выражается в нормах статьи 50 ФЗ «Об охране окружающей среды» [10], которая устанавливает запрет на выращивание и разведение генно-инженерно-модифицированных растений и животных соответственно. Ожидается, что подобный запрет приведет к утрате научного потенциала в сфере генетических технологий

в России в связи с отсутствием их востребованности в хозяйственном обороте [3].

2. В противоречие также вступают проблемы правового регулирования в административном и экологическом праве, выраженные в пересечении объектов правоотношений в сфере генетических технологий. Например, объекты правоотношений административной отрасли права относятся к предмету экологического права, в то время как ни статус микроорганизмов, ни статус отдельных категорий растений экологическим правом не определен. Это создает препятствие для реализации эффективных административных моделей и представляет собой пример, когда пробелы в одной отрасли препятствуют развитию другой отрасли права.

3. Инструменты административного права вступают в противоречие с инструментом правового регулирования экологической отрасли. Так, административное право предусматривает контроль и надзор безопасного производства и использования продуктов генетических технологий, однако производство продуктов также является предметом регулирования экологической отрасли, потому что оно касается живых организмов. В связи с этим запрет на выращивание ГМО также становится избыточным требованием при наличии контроля и надзора в административно-правовой модели.

4. Принципы экологического права противоречат целям информационного права. Принцип транспарентности информации, предусмотренный ФЗ «Об охране окружающей среды», не дает возможности разработать основы по предоставлению информации о генетических ресурсах, так как предусматривает полное ее раскрытие. Недопустимо также распространение принципа транспарентности информации при использовании генетических технологий в здравоохранении. Следует отметить, что генетическая информация не имеет обособленного статуса, при том что генетические ресурсы входят в предмет правоотношений экологического права, а информация о них — информационного права.

5. В информационном праве существует пробел о защите генетической информации человека. В случае планирования паспортизации появится коллизия с административным правом, так как ФЗ «О государственной геномной регистрации» [9] вводит понятие добровольной геномной регистрации. Любое ограничение принципа добровольности потребует изменения в законодательстве. При этом изменение принципов в сторону ограничения прав и свобод граждан не соответствует репутации правового и социального государства, а обоснование

таких ограничений может основываться исключительно на защите конституционных ценностей.

В соответствии с ФЗ «О государственной геномной регистрации» геномная информация — это персональные данные, включающие в себя кодированную информацию об определенных фрагментах дезоксирибонуклеиновой кислоты физического лица или неопознанного трупа, не характеризующих их физиологические особенности. П.1 статьи 3 Федерального закона от 27.07.2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных» относит к персональным данным любую информацию, относящуюся к прямо или косвенно определенному или определяемому физическому лицу (субъекту персональных данных). Так возникает вопрос правовой неопределенности сочетания норм указанных двух федеральных законов. По смыслу нормативных актов геномную информацию можно считать персональной, тем более, что практика Европейского суда по правам человека свидетельствует о том, что генетическую информацию можно отнести к персональным данным и, соответственно, государства обязаны гарантировать защиту этих данных.

6. Цели экологического права и проблемы информационного права также не находят баланс: обеспечение экологической безопасности, охрана природы и сохранение биоразнообразия никак не предусматривают деятельность биоресурсных центров и, тем более, применение генетических технологий. Экологическое право напрямую препятствует развитию генетических технологий, защищая окружающую среду, отказываясь от уникальных и во многом единственных способов сохранения биоразнообразия, то есть от собственной цели.

Юридическая наука на сегодняшний день имеет предпосылки выделить новый правовой институт оборота генетической информации. Институт должен включать нормы, устанавливающие принципы оборота и обработки информации, правовой режим биологических банков и Национальной базы генетической информации, а также охранительные нормы по государственному надзору за деятельностью субъектов в сфере оборота генетической информации и нормы, устанавливающие ответственность за правонарушения [6].

В настоящее время фокус в информационном праве в сфере геномных технологий сосредоточен на защите информации. Вместе с тем зарубежные ученые поднимают вопрос о смещении акцентов правового регулирования от контроля к доступу и от ограничения распространения информации — к условиям ее рационального и безопасного использования. Вопрос рассматривается в связи с

тем, что генетическая информация является не только частной сферой, но и публичной, так как ее применение сможет решить общественно значимые проблемы, в особенности, в сфере исследования причин заболеваний [13]. Проблема, связанная с ненамеренным распространением генетической информации о своих родственниках при публикации личных данных, также решается юридически. В настоящее время согласие на распространение генетических данных или их самостоятельная публикация находится в рамках прав и свобод индивидуума. Решение данного вопроса без ущемления личных прав и свобод состоит в ограничении распространения генетической информации ряда субъектов информационного права: юридических лиц, предоставляющих услуги по генетическому тестированию, а также официальных владельцев общественно доступных поисковых порталов, использующих базы генетических данных [14].

III. Определение сценариев совершенствования законодательства с учетом анализа открывающихся окон возможностей, ограничения перспектив, а также потенциальных проблем и рисков для каждого из сценариев

Дальнейшее совершенствование законодательства может идти по нескольким сценариям: а) точечные изменения в федеральных законах, позволяющие развивать и эффективно внедрять генетические технологии, б) комплексный пересмотр базового закона «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» с целью унификации принципов, подходов, целей и инструментов в сфере генно-инженерной деятельности, в) разработка нового фундаментального основополагающего закона в сфере генетических технологий.

Каждый сценарий имеет свои преимущества и ограничения, представленные в таблице 1.

Таблица 1

Оценка сценариев совершенствования законодательства в сфере генетических технологий

Сценарий	Окна возможностей	Ограничение перспектив	Проблемы и риски
А) Точечные изменения в законах, относящихся к различным отраслям права	Устранение пробелов в праве	Полностью остается проблема межотраслевого конфликта	Возникновение новых пробелов, новых конфликтов в ближайшем будущем и постоянно. Риск недостижения целевых показателей и внедрения результатов Федеральной программы по развитию генетических технологий
Б) Совершенствование ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности»	Установление понятий, целей, принципов, инструментов в сфере генно-инженерной деятельности (ГИД). Условное отграничение сферы ГМО от сферы генетических технологий	Возможности открываются только в сфере генно-инженерной деятельности и данной сферой ограничиваются. Недостаточность предпосылок установления правового статуса отдельных категорий организаций. Во многом остается проблема межотраслевого конфликта	Политические риски отказа от разработки самостоятельного основополагающего закона в сфере геномных технологий в будущем при наличии закона для регулирования сходной сферы
В1) Совершенствование ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» и разработка основополагающего закона в сфере геномных технологий	Установление понятий, целей, принципов, инструментов как в сфере генно-инженерной деятельности по всем направлениям использования ее результатов, так и в сфере геномных технологий в целом. Устранение межотраслевых противоречий. Разграничение «темы ГМО» и генетических технологий в плоскости общественного восприятия	В случае продолжения действия ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» будет сложнее перейти на продукт-ориентированную модель	Параллельная работа над двумя основополагающими проектами законов: масштабные поправки и подготовка нового согласованного проекта несет риски отдаления перспективы установления эффективной системы правового регулирования генетических технологий
В2) Утрата силы ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» и разработка основополагающего закона в сфере геномных технологий	Возможность перехода от концепции контроля безопасности технологии к продукт-ориентированной концепции	В настоящее время ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» несет в себе стимулирующий характер, в то время как в силу реализации принципа безопасности новый закон может нести больше ограничений в отношении ГИД	Проблема негативного восприятия обществом ГМО может транслироваться на новый закон

Сценарий точечных изменений использовался до настоящего времени и характерен для российского

нормотворчества в целом. Однако именно он привносит большое количество коллизий в праве, связанных как с

межотраслевым характером регулирования, так и с пересечением полномочий органов исполнительной власти в ходе государственного управления.

Сценарий совершенствования ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» ограничен возможностями актуализации без расширения предмета правового регулирования и его распространения на предмет регулирования экологического права. Указанный сценарий также не решает проблему межотраслевых конфликтов, либо повлечет необходимость гармонизации в сфере генетических технологий по всем отраслям права. При этом дальнейшие изменения в экологическом праве, информационном праве и других публичных и частных отраслях могут не согласовываться с законодательством в сфере генно-инженерной деятельности, которое впоследствии также будет изменяться в ходе совершенствования других отраслей во исполнение их целей.

Третий сценарий с разработкой нового закона не только упорядочит сферу регулирования генетических технологий, но и устранил пробелы в других отраслях права, не входя с ними в конфликт. Данная задача является наиболее сложной, однако в условиях иерархического равенства законов наибольшие правовые гарантии будет давать закон, который может стать основополагающим не только для генетических технологий, но и для экологической и информационной отраслей права. Широкий предмет правоотношений включит в себя основы по недостающим дефинициям в экологическом праве, недостающим подходам в информационном праве и недостающему единству подходов в административном праве. Этот закон может иметь наименование «Основы государственной политики» как в примере с законом о молодежной политике, о науке, либо «Основы законодательства в сфере генетических технологий» как в примере с реализованной таким образом схемой в сфере культуры и в сфере нотариата.

Типология законов по их юридической силе не предполагает введение основ законодательства как закона более высокой иерархии, однако в юридической науке есть основания, что им должны соответствовать другие законодательные акты. Общий характер и обилие бланкетных отсылок в действительности не создает правового регулирования, но

задает некие рамки как предпосылки правового регулирования, заполняя, пусть даже искусственно, пробелы законодательства. При этом большое значение имеет так называемая органическая внутренняя согласованность элементов регулирования, которое создается не в результате законотворческой техники, а вследствие реализации способа содержательного взаимодействия институтов и норм различных законов. Предметно-целевая ориентация норм различных отраслей права и функциональная согласованность норм права, позволяющая группировать нормы различных отраслей в один институт, обеспечивает эффективное действие права [8].

Соответствующий подход сможет привести к балансу между различными отраслями права в сфере регулирования генетических технологий.

IV. SWOT-анализ предпочтительных сценариев совершенствования законодательства в сфере генетических технологий

Несмотря на то, что SWOT-анализ применяется преимущественно в экономике, данный метод используется в настоящем исследовании, учитывая неопределенность в дальнейшем совершенствовании сферы правового регулирования генетических технологий и принципиально различные подходы зарубежных стран к данному вопросу.

Цель SWOT-анализа — вынесение стратегического решения для принятия одного из сценариев совершенствования законодательства. Так, например, соответствующий метод был использован при исследовании нормативно-правовой базы в области лекарственного обеспечения в целях разработки более совершенной законодательной системы для лечения больших диабетом и бронхиальной астмой в Казахстане [7].

SWOT-анализ также применялся в отношении нормативной правовой основы деятельности органов прокуратуры, который был взят в основу для увеличения сильных сторон анализируемых норм и благоприятных возможностей, с одной стороны, и минимизации слабых сторон и потенциальных угроз, с другой [1].

С целью обоснования выбора одного из сценариев совершенствования законодательства проведен анализ сильных и слабых сторон, а также возможностей и рисков при их реализации, который представлен в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

SWOT-анализ сценария развития законодательства при разработке основополагающего закона: предмет регулирования — генетические технологии

Возможности	Риски
Устранение многочисленных пробелов в праве в сфере генетических технологий. Устранение межотраслевых противоречий в праве.	В дальнейшем практически закрывается возможность принятия основополагающего закона в сфере биотехнологии.
Слабые стороны	Сильные стороны
Неизбежность отставания права от технологий. Обособленность генетических технологий от биотехнологий в целом.	Согласованность правового регулирования генетических технологий во всех отраслях права.

**SWOT-анализ сценария развития законодательства при разработке основополагающего закона:
предмет регулирования — биотехнологии**

Возможности	Риски
Устранение многочисленных пробелов в праве в сфере биотехнологий. Устранение межотраслевых противоречий в праве в сфере биотехнологии в целом. Возможность установления статуса всех категорий живых организмов, используемых в хозяйственных целях.	Юридические: широкая сфера, сложность согласования, недостаточная проработанность (в юридической науке). Технологические: потенциальные риски дополнительных юридических барьеров.
Слабые стороны	Сильные стороны
Неизбежность отставания права от технологий.	Согласованность применяемых инструментов правового регулирования биотехнологий во всех отраслях права и направлениях экономического развития. Единство принципов и целей правового регулирования биотехнологии во всех отраслях права.

Таким образом, при наложении матриц SWOT можно прийти к выводу, что потенциально более эффективным выглядит сценарий, при котором предметом правового регулирования основополагающего закона становятся биотехнологии в связи с большим количеством возможностей и сильных сторон, а также меньшим количеством слабых сторон.

Использование возможностей приведет не только к реализации целей Федеральной программы развития генетических технологий, но и внедрению тех направлений биотехнологий, которые не затрагивают сферу генетики. Это два направления: традиционное, с использованием биологических систем в производстве и современное, включающее в себя синтетическую биологию. Системный подход в правовом регулировании всей биотехнологии обеспечит поступательное развитие безопасного и устойчивого использования биоразнообразия.

В качестве меры укрепления слабой стороны может быть предложен переход с концепции, ориентирующейся на контроль технологии, на продукт-ориентированную концепцию, согласно которой контроль качества применения биотехнологий будет проводиться на основании контроля качества используемых продуктов с учетом специфики каждого направления использования.

Минимизация рисков может осуществляться путем сокращения сроков разработки проекта основополагающего закона и изменений действующего законодательства в условиях современной политики России, ориентированной на технологическую независимость.

Сильные стороны могут быть укреплены за счет смежных программ по сохранению биоразнообразия, информационной безопасности и иных стратегических проектов в сопутствующих отраслях права.

V. Описание административно-правовых моделей правового регулирования генетических технологий и оценка их реализации

На основании выявленных моделей административно-правового регулирования зарубежных стран [4] в целях оценки роли государства в развитии геномных исследований были приняты следующие критерии:

- степень государственного вмешательства в сферу геномных исследований;
- национальные экономические интересы в различных сферах применения геномных технологий;
- система оценки безопасности;
- предмет контроля;
- преобладающие методы правового регулирования.

В ходе исследования были определены три степени государственного участия в сфере геномных технологий: незначительная, умеренная и высокая. Незначительная степень отражается в отсутствии специального законодательства в сфере геномных исследований, обеспечивающего как контроль безопасности геномных исследований, так и стимулирования внедрения полезных технологий. В таких случаях выделены два противоположных административно-правовых подхода: включение сферы геномных технологий в другую, более крупную, сферу общественных отношений, регулируемую другими правовыми институтами, либо характеризующуюся отсутствием правового регулирования значительных по объему и количеству правоотношений в сфере геномных технологий. К первому типу незначительной степени правового участия относятся Канада и США, для которых геномные технологии во многом рассматриваются как новые технологии, а продукты геномных технологий как новые продукты. Ко второму типу незначительного государственного участия была отнесена Россия, причем государство реализует функцию ограничения геномных исследований. Умеренная степень государственного участия отмечается в странах с государственным стимулированием геномных технологий при наличии правовых пробелов в их регулировании (Китай, Индия, Бразилия).

Высокая степень выражается в детализации правоотношений во всех сферах геномных исследований (ЕС, Швейцария, Япония), причем как в стимулировании, так и в ограничении сферы геномных исследований в зависимости от отраслей их применения.

В соответствии с критерием учета национальных экономических интересов в развитии геномных исследований было выделено три типа регулирования: направленный на развитие национальных геномных технологий, направленный на привлечение инвестиций в сферу геномных технологий и направленный на использование зарубежных геномных технологий. К первому типу относятся США, Япония, Китай, Швейцария, ЕС, ко второму типу – Канада, Индия, Аргентина, Бразилия, Мексика. Первый тип подразумевает развитие агробιοтехнологий и биофармацевтики и инвестирование в данные сферы, причем не только и не обязательно в пределах территории своего государства. Второй тип предполагает привлечение денежных средств, не предусматривая государственного участия в правовом стимулировании развития геномных исследований. К третьему типу относятся страны, которые, во-первых, не получают экономические выгоды от геномных технологий, а, во-вторых, ставят под угрозу свою технологическую независимость. К данному типу относится Россия.

В отношении критерия оценки безопасности было выделено два принципа регулирования: основанный на презумпции опасности (Россия) и основанный на принципе относительной эквивалентности (ЕС и большинство стран), согласно которому технология/продукция, полученная с помощью методов геномной инженерии, сравнивается с традиционным методом/аналогом. Вне зависимости от принципов контроля было выделено два типа регулирования, устанавливающих систему контроля: эффективный и безопасный; неэффективный и потенциально опасный. К первому типу относятся ЕС, Швейцария, США, Канада, Япония, а также Россия в части контроля пищевой продукции. Ко второму типу можно отнести Китай и Индию.

Предмет контроля в исследуемой сфере может быть представлен одним из уровней в сфере геномных исследований: непосредственно исследованием, технологией геномных исследований и продуктом геномных исследований. В зависимости от предмета контроля государство обозначает принцип правового регулирования. Наиболее целесообразным представляется обоснованный продукт-ориентированный подход, так как цель государственного регулирования – обеспечить население полез-

ными и безопасными продуктами геномных исследований и технологий. При этом дополнительный контроль, установленный для верхних уровней, а именно: технологий и исследований, приводит к избыточному контролю, направленному на превентивную защиту от небезопасных геномных технологий. Такой избыточный уровень контроля, применяемый, в частности, в России, приводит к следующим последствиям: усложнению процедуры контроля в отношении более сложных характеристик разнообразных методов и технологий; необоснованным барьерам для новых технологий, так как основным критерием проверки становится не безопасность продукта, а сложность технологии.

Среди преобладающих методов правового регулирования в административном праве практикуются традиционно императивные, однако в США представлены диспозитивные методы, предоставляющие возможность доказать безопасность предлагаемых технологий и их эквивалентность природным модификациям. В России преобладают методы запрета.

В результате анализа административно-правовых подходов в сфере геномных исследований было определено шесть основных административно-правовых моделей, исходя из выработанных критериев оценки правового регулирования. Во всех эффективных моделях выделены следующие два показателя: оценка безопасности на основании принципа эквивалентности и контроль безопасности эффективный. Остальные типы, построенные по результатам анализа административно-правовых критериев, остаются с точки зрения правового регулирования очевидно неблагоприятными: контроль безопасности неэффективный; оценка безопасности основана на презумпции опасности; экономический интерес – использование готовых продуктов и технологий.

При этом три других показателя могут встречаться в различных сочетаниях: предметом контроля может являться как технология, так и продукт; участие государства в сфере генетических технологий может быть как умеренное, так и высокое; экономический интерес может выражаться как в развитии науки, так и в привлечении инвестиций.

Любой из сценариев правовой концепции совершенствования законодательства в сфере генетических технологий России предполагает одну из эффективных моделей с учетом выявленных критериев.

На основании полученных результатов категоризации административно-правовых моделей представляются три модели совершенствования законодательства:

Модель № 1

Основные характеристики административно-правовой модели: предмет — технологии/продукт, безопасность-эквивалентность, контроль — эффективный, экономический интерес — развитие науки, участие государства — высокое.

Перспективы:

- усиление контроля путем двойной степени обеспечения безопасности, первично на этапе применения технологий, а затем на использовании продуктов во всех экономических отраслях;
- переход на принцип существенной эквивалентности при оценке безопасности, что обеспечивает дополнительную гармонизацию с международным правом;
- реализация государственных программ в сфере геномных технологий и обеспечение национальной технологической независимости;
- необходимость дальнейшего стимулирования научных разработок и их внедрения со стороны государства.

Риски:

- избыточный контроль, направленный на технологии, увеличивающий стоимость продукции;
- необходимость детальной проработки методической нормативной базы для реализации принципа эквивалентности, риск необоснованного отказа в регистрации продукции;
- снижение инвестиционной привлекательности сферы в случае снижения затрат из бюджета;

Предполагаемые изменения в публичных отраслях права:

- международное право (ратификация международных договоров в исследуемой сфере);
- налоговое право (стимулирование);
- таможенное право (защита национальных интересов в целях предотвращения избыточного влияния зарубежных компаний).

Модель № 2

Основные характеристики административно-правовой модели: предмет — технологии/продукт, безопасность-эквивалентность, контроль — эффективный, экономический интерес — привлечение инвестиций, участие государства — умеренное.

Перспективы:

- усиление контроля путем двойной степени обеспечения безопасности: первично на этапе применения технологий, а затем на использовании продуктов во всех экономических отраслях;

- переход на принцип существенной эквивалентности при оценке безопасности, что обеспечивает дополнительную гармонизацию с международным правом;
- потребуются создание органа исполнительной власти, обеспечивающего единство принципов государственной поддержки геномных технологий во всех сферах, а также контроля их безопасности.

Риски:

- избыточный контроль, направленный на технологии, увеличивающий стоимость продукции;
- модель требует детальной проработки методической нормативной базы для реализации принципа эквивалентности, риск необоснованного отказа в регистрации продукции;
- потенциальная утрата технологической независимости.

Предполагаемые изменения в публичных отраслях права:

- международное право (ратификация международных договоров в исследуемой сфере);
- налоговое право (стимулирование);
- экологическое право (зонирование территорий, предполагаемых для внедрения агробiotехнологий);
- уголовное право (составы преступлений в целях противоправных действий при активизации деятельности зарубежных компаний);
- таможенное право (защита национальных интересов в целях предотвращения избыточного влияния зарубежных компаний).

Модель № 3

Основные характеристики административно-правовой модели: предмет — продукт, безопасность-эквивалентность, контроль — эффективный, экономический интерес — развитие науки, участие государства — умеренное.

Перспективы:

- переход на продукт-ориентированную парадигму, снижение стоимости конечного продукта;
- направлен на реализацию государственных программ в сфере геномных технологий и обеспечение национальной технологической независимости;
- требует дальнейшего стимулирования научных разработок и их внедрения со стороны государства.

Риски:

- модель требует пересмотра всей правовой парадигмы, отказа от презумпции опасности технологий;

- неготовность общества принять новую парадигму правового отрицания ГМО;
- Предполагаемые изменения в публичных отраслях права:
- уголовное право (составы преступлений в целях противоправных действий при активизации деятельности зарубежных компаний);
 - таможенное право (защита национальных интересов в целях предотвращения избыточного влияния зарубежных компаний).

Заключение

На основании проведения исследования предполагаемых направлений совершенствования законодательства в сфере геномных технологий сделаны следующие выводы:

1. Основной гарантией избежать правовые коллизии между административной, экологической и информационной отраслями права становится разработка основополагающего закона, устанавливающего общие дефиниции, принципы, цели и инструменты правового регулирования.

2. Наиболее эффективным сценарием развития законодательства в сфере генетических технологий на основании SWOT-анализа определяется модель разработки основополагающего закона в сфере биотехнологии в форме основ законодательства или государственной политики с параллельным внесением изменений и актуализацией действующего законодательства.

3. Сценарий может сопровождаться одной из описанных эффективных моделей правового регулирования со следующими административно-правовыми характеристиками: предмет регулирования — продукт технологий, безопасность основана на принципе эквивалентности, контроль обеспечивает безопасность применения технологий, экономический интерес государства основан на развитии науки, степень участия государства — высокая.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-29-14024).

Литература

1. *Иманов И.А.* SWOT-анализ нормативной правовой основы деятельности органов прокуратуры по надзору за исполнением законов о противодействии коррупции в Республике Казахстан как основа ее совершенствования // *Бизнес в законе.* — 2016. — № 1. — С. 229–234.

2. *Кожокаръ И.П.* Коллизии правовых норм как изъян системы российского права // *Юридическая наука.* — 2019. — № 4. — С. 15–21.
3. *Коробко И.В. и др.* ГМО в России — наука, общество и закон // *Acta Naturae.* — 2016. — Т. 8. — № 4(31). — С. 6–15.
4. *Петушкова Ю.А., Каменский П.А.* Роль административно-правового регулирования в развитии геномных технологий на примере России и зарубежных стран // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* — 2020. — Т. 16. — № 3. — С. 43–51.
5. Постановление Правительства РФ от 22 апреля 2019 г. № 479 «Об утверждении федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на период 2019–2027 годы». Электронный ресурс. Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201904230021>.
6. *Расолов И.М., Чубукова С.Г.* Институт правового обеспечения оборота генетической информации: парадигма будущего информационного права // *Геном.* — 2021. — Т. 74. — № 311(180). — С. 92–100.
7. *Сатаева Л.Г., Мошкова Л.В.* Использование SWOT-анализа для улучшения качества лекарственного обеспечения больных диабетом и бронхиальной астмы в Республике Казахстан // *Проблемы эндокринологии.* — 2012. — № 4. — С. 32–34.
8. *Тихомиров Ю.А., Бошно С.В.* Теоретические основы классификации законов // *Право и современные государства.* — 2018. — № 2–3. — С. 9–19.
9. Федеральный закон от 03.12.2008 № 242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации». СЗ РФ, 08.12.2008, № 49, ст. 5740.
10. Федеральный закон от 10 января 2002 г. N 7-ФЗ «Об охране окружающей среды» (в ред. от 31.07.2020). СЗ РФ от 14 января 2002 г. N 2 ст. 133. Электронный ресурс. Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202007310072>.
11. Федеральный закон от 28 июня 2014 г. N 172-ФЗ «О стратегическом планировании в Российской Федерации» (в ред. от 31.07.2020). Электронный ресурс. Режим доступа: <http://pravo.gov.ru/proxy/ips/?docbody&nd=102354386>.
12. Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (ред. от 02.07.2021). СЗ РФ, 08.07.1996, № 28, ст. 3348.
13. *Clayton E.W. et al.* The law of genetic privacy: applications, implications, and limitations // *Journal of Law and the Biosciences.* — 2019. — Vol. 6. — No. 1. — P. 1–36.
14. *Park J.Y. et al.* Privacy in direct-to-consumer genetic testing // *Clinical Chemistry.* — 2018. — Vol. 65. — No. 5. — P. 612–617.

References

1. Imanov IA. SWOT-analiz normativnoy pravovoy osnovy deyatel'nosti organov prokuratury po nadzoru za ispolneniyem zakonov o protivodeystvii korruptsii v Respublike Kazakhstan kak osnova yeye sovershenstvovaniya. *Biznes v zakone* 2016; 1:229–234 (in Russian).
2. Kozhokar' IP. Kollizii pravovykh norm kak iz'yan sistemy rossiyskogo prava. *Yuridicheskaya nauka* 2019; 4:15–21 (in Russian).
3. Korobko IV i dr. GMO v Rossii – nauka, obshchestvo i zakon. *Acta Naturae* 2016; 8(4):6–15 (in Russian).
4. Petushkova YuA, Kamenskiy PA. Rol' administrativno-pravovogo regulirovaniya v razvitii genomnykh tekhnologiy na primere Rossii i zarubezhnykh stran. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova* 2020; 16(3):43–51 (in Russian).
5. Postanovleniye Pravitel'stva RF ot 22 aprelya 2019 g. № 479 «Ob utverzhdenii federal'noy nauchno-tekhnicheskoy programmy razvitiya geneticheskikh tekhnologiy na period 2019–2027 gody». URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201904230021> (in Russian).
6. Rassolov IM, Chubukova SG. Institut pravovogo obespecheniya oborota geneticheskoy informatsii: paradigma budushchego informatsionnogo prava. *Genom* 2021; 74(311):92–100 (in Russian).
7. Satayeva LG, Moshkova LV. Ispol'zovaniye SWOT-analiza dlya uluchsheniya kachestva lekarstvennogo obespecheniya bol'nykh diabetom i bronkhial'noy astmy v Respublike Kazakhstan. *Problemy endokrinologii* 2012; 4:32–34 (in Russian).
8. Tikhomirov YuA., Boshno SV. Teoreticheskiye osnovy klassifikatsii zakonov. *Pravo i sovremennyye gosudarstva* 2018; 2–3:9–19 (in Russian).
9. Federal'nyy zakon ot 03.12.2008 № 242-FZ «O gosudarstvennoy genomnoy registratsii v Rossiyskoy Federatsii». *SZ RF*, 08.12.2008, № 49, st. 5740 (in Russian).
10. Federal'nyy zakon ot 10 yanvarya 2002 g. N 7-FZ «Ob okhrane okruzhayushchey sredy» (v red. ot 31.07.2020). *SZ RF* ot 14 yanvarya 2002 g. N 2 st. 133. URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202007310072> (in Russian).
11. Federal'nyy zakon ot 28 iyunya 2014 g. N 172-FZ «O strategicheskoy planirovani v Rossiyskoy Federatsii» (v red. ot 31.07.2020). URL: <http://pravo.gov.ru/proxy/ips/?docbody&nd=102354386> (in Russian).
12. Federal'nyy zakon ot 5 iyulya 1996 g. № 86-FZ «O gosudarstvennom regulirovani v oblasti genno-inzhenernoy deyatel'nosti» (red. ot 02.07.2021). *SZ RF*, 08.07.1996, № 28, st. 3348 (in Russian).
13. Clayton EW et al. The law of genetic privacy: applications, implications, and limitations. *Journal of Law and the Biosciences* 2019; 6(1):1–36.
14. Park JY et al. Privacy in direct-to-consumer genetic testing. *Clinical Chemistry* 2018; 65(5):612–617.

POLYSCENARIO CONCEPT FOR THE LEGISLATION IMPROVEMENT IN THE FIELD OF GENETIC TECHNOLOGIES IN THE RUSSIAN FEDERATION: PROMOTION, SAFETY, CROSS-SECTORAL CONFLICTS OF LAWS ELIMINATION

Yu.A. PETUSHKOVA, P.A. KAMENSKI

Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The article is aimed to develop the concept for legislation improvement in the field of genetic technologies. The criteria for the main cross-sectoral legal contradiction were determined as well as the conflicts of law in the administrative, environmental and information branches of law were revealed. The legislative development ways in the context of state strategies and programs were substantiated. The SWOT analysis for the main scenarios of legislation improvement as a tool for strategic evaluation in law was applied. The estimation of different legal regulation model for the Russian Federation policy was carried out.

Keywords: genomic technologies, SWOT analysis, models of legal regulation, cross-sectoral legal contradiction.

Address:

Petushkova Yu.A., Ph.D.
Senior researcher Department of Bioengineering,
Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University
E-mail: jupponline@gmail.com

Для цитирования:

Петушкова Ю.А., Каменский П.А. Полисценарная концепция совершенствования законодательства в сфере геномных технологий в Российской Федерации: стимулирование, безопасность и устранение межотраслевых правовых противоречия. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(2):25–35.

For citation:

Petushkova Yu.A., Kamenski P.A. Polyscenario concept for the legislation improvement in the field of genetic technologies in the Russian Federation: promotion, safety, cross-sectoral conflicts of laws elimination. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(2):25–35 (in Russian).

ОЦЕНКА ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВВЕДЕНИЕ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.В. ТЮРИНА*, Л.В. ЛАРИОНОВА, А.В. ФИЛИППЕНКО, Н.Д. ОМЕЛЬЧЕНКО,
А.А. ТРУФАНОВА, Д.И. СИМАКОВА, И.А. ИВАНОВА, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, М.П. ПОГОЖОВА,
А.О. АНОПРИЕНКО, Н.И. ПАСЮКОВА

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», Ростов-на-Дону

При разработке новых лечебно-профилактических препаратов на основе бактериофагов необходимо учитывать формирование иммунного ответа макроорганизма на их введение. Целью работы являлось изучение гуморального иммунного ответа у экспериментальных животных после первичного и повторного применения холерных бактериофагов. В работе использовали холерные фаги Rostov-M3, Rostov-13, лизирующие холерные вибрионы O1 серогруппы и ФБ, обладающий литической активностью в отношении холерных вибрионов O139 серогруппы, а также смесь этих фагов. Взрослым кроликам вводили бактериофаги перорально в течение трех, пяти и семи дней. Через четыре месяца тем же животным повторно давали бактериофаги в тех же дозах и по тем же схемам. Наличие гуморального иммунитета после применения бактериофагов выявляли методом ИФА с помощью сконструированной тест-системы, определяли титры специфических иммуноглобулинов в сыворотках крови взрослых кроликов через неделю после окончания приема бактериофагов. Результаты исследования свидетельствуют о том, что однократное курсовое применение препаратов как в отдельности, так и в смеси не вызывает формирования специфических к холерным бактериофагам антител; однако повторное их введение приводит к появлению антифаговых иммуноглобулинов класса G. Особенно высокая продукция антител была зарегистрирована при использовании фага Rostov-M3, даже после трехдневного курса. Интересно, что повторное введение смеси этих бактериофагов не вызывает сильной активации гуморального звена иммунитета у взрослых кроликов, титры антител сохраняются на более низком, по сравнению с сыворотками контрольных животных, уровне при всех схемах применения коктейля препаратов.

Ключевые слова: бактериофаги, профилактика холеры, гуморальный иммунитет, иммуноглобулины.

Введение

Сезонные подъемы заболеваемости холерой, постоянный риск заноса инфекции с эндемичных территорий, а также преобладание антибиотикорезистентных штаммов холерного вибриона различных сероваров над чувствительными [9] свидетельствуют о необходимости создания новых подходов в лечении и профилактике этого заболевания.

Одним из перспективных направлений в борьбе с бактериальными патогенами является использование

лечебных и профилактических препаратов на основе бактериофагов [4]. Несомненным преимуществом фаговой терапии и профилактики служат строгое селективное действие, отсутствие влияния на микрофлору, токсических и побочных эффектов, безопасность приема во время беременности и у пациентов с аллергическими реакциями на антибиотики, сокращение длительности лечения за счет быстрого действия и глубокого проникновения в очаг инфекции [16, 17]. Сюда же входит и полная совместимость с любыми лекарственными средствами, в том числе и с антибиотиками, что делает терапию антибиотиками более эффективной [1].

В настоящее время лидирующие позиции в мире по разработке и производству фаговых препаратов занимают Россия и Грузия [7]. Изучение возможностей фаготерапии многих бактериальных инфекций также проводят исследователи в Польше, Англии, США [5, 6, 14]. В литературе имеются данные о повышенной устойчивости возбудителей внутрибольничных инфекций

© 2022 г. Тюрина А.В., Ларионова Л.В., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Симакова Д.И., Иванова И.А., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Аноприенко А.О., Пасюкова Н.И.

* Автор для переписки:

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

к известным дезинфицирующим средствам [10]. Устойчивость к дезинфектантам является причиной широкого использования смесей бактериофагов для обработки медицинских помещений [11].

На Западе с успехом ведутся исследования по фаготерапии и фагопрофилактике холеры на экспериментальных животных [13, 15, 18]. Данные результаты по холере в опытах *in vivo* показывают эффективность устранения холерных вибрионов в отделах кишечника новорожденных кроликов как до, так и после заражения [13].

Таким образом, бактериофаги являются безопасной альтернативой антимикробным препаратам, а при профилактике холеры смогут снизить спорадические случаи этой инфекции.

При создании фаговых профилактических и лечебных препаратов необходимо комплексно исследовать их влияние на макроорганизм, оценить безопасность и эффективность применения [2]. Подобным образом должны учитываться условия и длительность персистенции бактериофагов в организме, а также активация специфического иммунного ответа на вирусные частицы [3], поскольку иммунные реакции могут снизить эффективность биопрепаратов. При разработке новых средств на основе бактериофагов для профилактики холеры этот вопрос требует детального исследования, потому что такие исследования еще не проводились. Вследствие вышесказанного поиск бактериофагов представляется весьма актуальным и определил цель настоящего исследования.

Цель работы заключалась в изучении гуморального иммунного ответа у экспериментальных животных на первичное и повторное введение холерных бактериофагов.

Материалы и методы

Были отобраны холерные бактериофаги Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 из коллекции лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора». При отборе бактериофагов учитывались следующие показатели: специфичность литического действия в отношении вибрионов, максимально высокая репродуктивная активность, степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов. Также были проведены полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ всех трех отобранных фагов.

Для оценки формирования гуморального иммунитета взрослым кроликам в течение 3, 5 и 7 дней вводили перорально по 3 мл суспензии бактериофагов: Rostov-M3 — 5×10^8 БОЭ/мл, Rostov-13 — 2×10^8 БОЭ/мл, ФБ1 — 2×10^8 БОЭ/мл, а также смесь этих фагов (Rostov-M3 + Rostov-13 + ФБ1) в соотношении 1:1:1. Через четыре месяца курс повторяли по такой же схеме. Контрольные кролики получали перорально физиологический раствор по тем же схемам и в том же объеме.

Забор крови у экспериментальных животных осуществляли через неделю после окончания первичного и повторного курсов приема фагов.

Гипериммунные специфические сыворотки получали путем внутривенной иммунизации кроликов возрастающими дозами холерных бактериофагов Rostov-13, Rostov-M3, ФБ1, а также их смесью по методу Ю.Н. Марьиной [8].

Для определения антифаговых антител использовали метод ИФА. При сенсibilизации в лунки полистиролового 96-луночного планшета для иммуноферментного анализа вносили 50 мкл фаговых частиц в концентрации 10^7 и инкубировали в холодильнике в течение 16–18 часов. Затем удаляли взвесь фаговых частиц и лунки трижды промывали забуференным физиологическим раствором с твин-20 (ЗФР-Т). После этого в лунки вносили блокирующий 1%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина в ЗФР-Т и инкубировали при 37°C в течение часа, удаляли блокирующий раствор и, не промывая, вносили в каждую лунку по 100 мкл исследуемых и контрольных положительных сывороток в разведениях от 1:100 до 1:6400. В качестве отрицательных контролей использовали забуференный физиологический раствор и сыворотку интактных кроликов в разведении 1:100. Инкубировали при 37°C в течение часа. По окончании инкубации сыворотки удаляли и лунки пятикратно промывали ЗФР-Т. В каждую лунку вносили по 100 мкл антикроличьего конъюгата в разведении 1:10000 и инкубировали при 37°C в течение часа. После этого конъюгат удаляли и лунки промывали пятикратно раствором ЗФР-Т и вносили по 100 мкл раствора хромогена — тетраметилбензидин (ТМБ), инкубировали в течение 15 минут в темном месте, а развившуюся цветную реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента. Результаты реакции учитывали в приборе «Мультискан» при длине волны 450 мкм в программе «Магеллан».

Общий пул противохолерных антител в сыворотке крови кроликов определяли в твердофазном иммунофер-

ментном анализе (ИФА) в трех повторностях с расчетом среднегеометрических значений титров [12].

Результаты и обсуждение

Наиболее перспективными для профилактики холеры в опытах *in vivo* оказались холерные фаги, обладающие высокой литической активностью. Rostov-M3 имеет широкий диапазон литической активности в отношении холерных вибрионов биовара *Classical* (83,3%); литическая активность Rostov-13 распространяется только на холерные вибрионы биовара *El Tor*, но в высоком проценте (97%); ФБ1 имеет литическую активность 50% в отношении *Vibrio cholerae* O139 серогруппы. Проведенное секвенирование и биоинформационный анализ показали, что в геномах этих бактериофагов не обнаружено генетических детерминант, факторов резистентности и токсинов, которые характерны для умеренных фагов. Поэтому все выбранные бактериофаги являются литическими (вирулентными), что позволяет рассматривать их в качестве компонентов профилактических препаратов против холеры. Из отобранных бактериофагов была составлена композиция в соотношении 1:1:1, на основе которой впоследствии планируется создание экспериментального фагового препарата для профилактики холеры.

В связи с тем, что не существует коммерческих диагностических тест-систем для определения антифаговых иммуноглобулинов (Ig), наши исследования были начаты с конструирования тест-системы для выявления антител к холерным бактериофагам иммуноферментным методом в сыворотке крови экспериментальных животных. В результате была разработана иммуноферментная тест-система для обнаружения антифаговых Ig, которая построена следующим образом: антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета, затем в лунки вносили исследуемый образец, а связавшиеся с антигеном IgG выявляли с помощью конъюгата антител козы к IgG и IgM, IgA кролика («Имтек», Россия), меченного пероксидазой хрена, — по ферментной реакции, с последующим добавлением субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Положительным контролем служила кроличья гипериммунная сыворотка к бактериофагу, заведомо содержащая соответствующие антитела, а отрицательным контролем — физиологический раствор и сыворотки интактных кроликов.

Исследование с помощью данной тест-системы кроличьих сывороток к холерным фагам Rostov-M3 и Rostov-13, полученных после 3-, 5- и 7- дневного первичного приема бактериофагов, показало отсутствие

гуморального иммунного ответа к данным препаратам. Только бактериофаг ФБ1 индуцировал продукцию специфических иммуноглобулинов в очень низких, по сравнению с положительным контролем, титрах после семидневного введения. У экспериментальных животных, получавших коктейль из исследуемых фагов в течение 3, 5 и, особенно, 7 дней в сыворотке определялось наличие антител к данным фагам, но в титрах более низких, чем в гипериммунных, сыворотках (табл. 1).

Таблица 1

Наличие иммуноглобулинов в сыворотке крови экспериментальных животных после однократного курса холерных бактериофагов

Препараты бактериофагов	Сроки введения			Титр контрольных положительных сывороток
	3 дня	5 дней	7 дней	
Rostov-M3	отриц.	отриц.	отриц.	1:1280
Rostov-13	отриц.	отриц.	отриц.	1:1280
ФБ1	отриц.	отриц.	1:100	1:1280
Смесь фагов	1:100	1:100	1:200	1:6400

Результаты изучения антителопродукции после повторного применения фагов показали, что уже трехдневный курс Rostov-M3 приводит к появлению соответствующих антифаговых Ig в высоком титре (табл. 2). При этом следует отметить, что у кроликов, получавших Rostov-13 и ФБ1, продукция антител регистрируется после семидневного курса этих фагов. Интересно, что повторное введение смеси бактериофагов не вызывает сильной активации гуморального звена иммунитета у взрослых кроликов, титры антител сохраняются на относительно низком уровне, по сравнению с гипериммунными животными, независимо от схемы применения коктейля препаратов.

Таблица 2

Наличие иммуноглобулинов в сыворотке крови экспериментальных животных после повторного курса холерных бактериофагов

Препараты бактериофагов	Сроки введения			Титр контрольных положительных сывороток
	3 дня	5 дней	7 дней	
Rostov-M3	1:800	1:800	1:1600	1:6400
Rostov-13	отриц.	отриц.	1:1600	1:6400
ФБ1	отриц.	отриц.	1:1600	1:6400
Смесь фагов	1:200	1:200	1:400	1:6400

Заключение

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что, независимо от длительности введения бактериофагов, один курс фагопрофилактики Rostov-M3 и Rostov-13 не вызывает продукции специфических иммуноглобулинов, в отличие от ФБ1. Однако повторный курс, даже трехдневный, приводит к появлению соответствующих антифаговых антител, что согласуется с данными литературы [14, 15] при исследовании других инфекций.

Коктейль исследуемых фагов индуцировал более низкие, по сравнению с положительными гипериммунными сыворотками, титры специфических антител как при первичном, так и вторичном применении.

Таким образом, полученные нами данные выявили активацию гуморального звена иммунитета у экспериментальных животных под влиянием холерных бактериофагов, особенно при повторных курсах фагопрофилактики. Проведенное исследование подтвердило необходимость выявления соответствующих антител при фагопрофилактике холеры для обеспечения своевременной корректировки штаммового состава профилактических препаратов, особенно при проведении повторных курсов. Кроме того, для сохранения эффективности фагопрофилактики, в случае смены штамма возбудителя, необходимо своевременное изменение состава коктейля бактериофагов для поддержания необходимого уровня спектра его литической активности.

Литература

1. 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.
2. 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. эпид. и иммунобиол. — 2017. — № 4. — С. 42–48.
3. Иванова И.А., Труфанова А.А., Филиппенко А.В., Беспалова И.А., Омельченко Н.Д. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2019. — № 6. — С. 79–85.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Лыско К.А., Отрашевская Е.В., Игнатъев Г.М. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: краткий обзор производства и применения // Биопрепараты. — 2013. — № 4. — С. 4–9.
8. Марьина Ю.Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага // Труды Ростовского противочумного института. — 1941. — Т. 2. — С. 3–7.
9. 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.
10. Нестерова Д.Д., Петрова А.А., Лукьяненко Н.В., Бобровский Е.А. Оценка эффективности мониторинга чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, выделенных от пациентов КГБУЗ «Краевая клиническая больница» в рамках микробиологического надзора за ИСМП (г. Барнаул) в 2013–2017 гг. // Журнал инфектологии. — 2019. — Т. 11. — № 1 S1. — С. 88.
11. Пунченко О.Е., Косякова К.Г., Румянцева М.В. Использование бактериофагов для биологической дезинфекции помещений // Актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований. — 2016. — С. 22–24.
12. Щуковская Т.Н., Корсуков В.Н. Характеристика популяций Т- и В-лимфоцитов в организме экспериментальных животных в процессе формирования иммунитета к холере / Патологическая физиология, иммунология и аллергология особо опасных инфекций, 1984. — С. 70–76.
13. Bhandare S., Colom J., Baig A., Ritchie J., Bukhari H. Reviving phage therapy for the treatment of cholera // The Journal of Infectious Diseases. — 2019. — Vol. 219. — No. 5. — P. 786–794.

14. 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.
15. 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.
16. Sulakvelidze A. Challenges of bacteriophage therapy. Industrial Pharmaceutical Microbiology // Indust. Pharmacy. — 2011. — Vol. 45. — No. 31. — P. 14–18.
17. 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.
18. 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. — Art. 14187. doi: 10.1038/ncomms14187.
7. Lysko KA, Otrashesvskaya YeV, Ignat'yev GM. Lechebno-profilakticheskiye preparaty bakteriofagov: kratkiy obzor proizvodstva i primeneniya. Biopreparaty 2013; 4:4–9 (in Russian).
8. Mar'ina YuN. Polucheniye antifagovoy syvorotki i izucheniye antigennoy struktury faga. Trudy Rostovskogo protivochumnogo instituta 1941; 2:3–7 (in Russian).
9. 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).
10. Nesterova DD, Petrova AA, Luk'yanenko NV, Bobrovskiy YeA. Otsenka effektivnosti monitoringa chuvstvitel'nosti k dezinfitsiruyushchim sredstvam mikroorganizmov, vydelennykh ot patsiyentov KGBUZ «Krayevaya klinicheskaya bol'nitsa» v ramkakh mikrobiologicheskogo nadzora za ISMP (g. Barnaul) v 2013–2017 gg. Zhurnal infektologii 2019; 11(1 S1):88 (in Russian).

References

1. 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).
2. 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 meditsinskoj pomoshchi, v otdelenii neyroreanimatsii. Zhurn mikrobiol epid i immunobiol 2017; 4:42–48 (in Russian).
3. Ivanova IA, Trufanova AA, Filippenko AV, Bespalova IA, Omel'chenko ND. Bakteriofagi i immunnaya sistema makroorganizma. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2019; 6:79–85 (in Russian).
4. 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).
5. Kiseleva IA. Bakteriofagi v profilaktike infektsiy, svyazannykh s okazaniyem meditsinskoj pomoshchi: puti povysheniya effektivnosti. Materialy II Nats kong bakteriologov. Infektsiya i immunitet 2016; 6(3):43–44 (in Russian).
6. Krasil'nikov IV, Lobastova AK, Lysko KA. Nekotoryye aspekty sovremennogo sostoyaniya i perspektivnykh napravleniy razvitiya proizvodstva i primeneniya lechebno-profilakticheskikh preparatov bakteriofagov. Biopreparaty 2010; 2(38):28–33 (in Russian).
11. Punchenko OYe, Kosyakova KG, Rumyantseva MV. Ispol'zovaniye bakteriofagov dlya biologicheskoy dezinfektsii pomeshcheniy. Aktual'nyye napravleniya fundamental'nykh i prikladnykh issledovaniy 2016; 22–24 (in Russian).
12. Shchukovskaya TN, Korsukov VN. Kharakteristika populyatsiy T- i V-limfotsitov v organizme eksperimental'nykh zhivotnykh v protsesse formirovaniya immuniteta k kholere. Patologicheskaya fiziologiya, immunologiya i allergologiya osobo opasnykh infektsiy, 1984: 70–76 (in Russian).
13. Bhandare S, Colom J, Baig A, Ritchie J, Bukhari H. Reviving phage therapy for the treatment of cholera. The Journal of Infectious Diseases 2019; 219(5):786–794.
14. Chanishvili N. Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. Adv Virus Res 2012; 83:3–40.
15. 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.
16. Sulakvelidze A. Challenges of bacteriophage therapy. Industrial Pharmaceutical Microbiology. Indust Pharmacy 2011; 45(31):14–18.
17. 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.
18. 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. doi: 10.1038/ncomms14187.

ASSESSMENT OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO THE INTRODUCTION OF CHOLERA BACTERIOPHAGES IN EXPERIMENTAL ANIMALS

A.V. TYURINA, L.V. LARIONOVA, A.V. FILIPPENKO, N.D. OMELCHENKO,
A.A. TRUFANOVA, D.I. SIMAKOVA, I.A. IVANOVA, N.E. GAEVSKAYA, M.P. POGOZHOVA,
A.O. ANOPRIENKO, N.I. PASUKOVA

*Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and
Human Welfare, Rostov-on-Don*

When developing new therapeutic and prophylactic drugs based on bacteriophages, it is necessary to take into account the formation of the immune response of the macroorganism to their administration. The aim of the work was to study the humoral immune response in experimental animals after the primary and repeated use of cholera bacteriophages. We used cholera phages Rostov-M3, Rostov-13, which lyse vibrios cholerae O1 serogroup, and FB, which has lytic activity against vibrios cholerae O139 serogroup, as well as a mixture of these phages. Adult rabbits were administered bacteriophages orally for three, five and seven days. Four months later, the same animals were given bacteriophages again in the same doses and according to the same schemes. The presence of humoral immunity after the use of bacteriophages was detected by ELISA using a designed test system, the titers of specific immunoglobulins in the blood sera of adult rabbits were determined a week after the end of the bacteriophage intake. The results of the study indicate that a single course use of drugs, both individually and in a mixture, does not cause the formation of antibodies specific to cholera bacteriophages; however, their repeated administration leads to the appearance of class G antiphage immunoglobulins. Especially high production of antibodies was registered when using phage Rostov-M3, even after a three-day course. Interestingly, the repeated administration of a mixture of these bacteriophages does not cause a strong activation of the humoral link of immunity in adult rabbits; antibody titers remain at a lower level compared to the sera of control animals for all schemes of using the drug cocktail.

Keywords: bacteriophages, cholera prevention, humoral immunity, immunoglobulins.

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., Ларионова Л.В., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Симакова Д.И., Иванова И.А., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Анопrienko А.О., Пасюкова Н.И. Оценка гуморального иммунного ответа на введение холерных бактериофагов у экспериментальных животных. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(2):36–41.

For citation:

Tyurina A.V., Larionova L.V., Filippenko A.V., Omelchenko N.D., Trufanova A.A., Simakova D.I., Ivanova I.A., Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Pasukova N.I. Assessment of the humoral immune response to the introduction of cholera bacteriophages in experimental animals. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(2):36–41 (in Russian).

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПЦР ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS STUTZERI*

Т.А. ФЕДОТОВА^{1*}, И.И. БОГДАНОВ¹, А.В. МАСТИЛЕНКО²,
А.А. ЛОМАКИН¹, Л.П. ПУЛЬЧЕРОВСКАЯ¹, Д.А. ВАСИЛЬЕВ¹

¹Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Ульяновск,
²ООО «ТестГен»

Статья посвящена разработке тест-системы на основе ПЦР для молекулярно-генетической идентификации бактерий *Pseudomonas stutzeri*. Это актуально на данный момент ввиду того, что бактерии вида *P. stutzeri* мало изучены, есть сложности с их выявлением и в научной литературе не найдено данных о постановке ПЦР по бактериям *P. stutzeri*. В ходе исследования был проведен подбор праймеров, специфичных в отношении участка генома искомого микроорганизма, экспериментальным путем к ним подобрана оптимальная программа амплификации и электрофореза для качественной, специфичной постановки ПЦР. Данная разработанная тест-система на основе ПЦР для молекулярно-генетической идентификации бактерий *P. stutzeri* была протестирована и подтвердила свою способность идентифицировать бактерии *Pseudomonas* от их ассоциатов.

Ключевые слова: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas*, полимеразная цепная реакция, ПЦР, молекулярно-генетическая идентификация, праймер, ген, нуклеотидная последовательность.

Введение

Бактерии вида *Pseudomonas stutzeri* являются подвижными грамотрицательными, условно-патогенными палочками и широко распространены во многих природных ареалах [5, 8, 10, 23]. Их обнаруживают в очистных сооружениях, сточных, морских и грунтовых водах, почве, гумусе, навозе, соломе [10, 23]. Выделяют из объектов больничной среды [9] и из клинического материала людей [15, 18, 19], животных [1, 13, 20]. Находят в испорченных продуктах [17]. Они способны проявлять фактор патогенности и вызывать заболевания, являться причиной гнойно-септических процессов у человека и животных. Выявленные случаи инфицирования живых организмов бактериями вида *Pseudomonas stutzeri* описаны в научной литературе [14, 15, 19, 22]. Значение их в патогенезе у человека, домашних и сельскохозяйственных животных, а также

роль в порче продуктов и, как следствие, в пищевых отравлениях изучаются. Они являются биодеструкторами и исследуются в этом направлении [3].

На данный момент необходима разработка высокоэффективного и быстрого метода индикации и дифференцирования бактерий вида *P. stutzeri* от других микроорганизмов, выделяемых из патологического материала и объектов внешней окружающей среды, так как они мало изучены и есть сложности с их выявлением. ПЦР является высокоточным методом молекулярно-генетической диагностики и активно используется в настоящее время, а данных о постановке ПЦР по бактериям *Pseudomonas stutzeri* в научной литературе не найдено.

Ввиду этого целью работы стала разработка тест-системы на основе ПЦР для молекулярно-генетической идентификации бактерий *Pseudomonas stutzeri*.

Материалы и методы

В работе были использованы: набор реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК (ДНК-технологии, Россия), 2,5× реакционная смесь и ddH₂O (Синтол, Россия), 10× Tris-боратный буфер (Bio-Rad, Германия), агароза (ДНК-Технология, Россия), 1% Ethidium Bromide solution (AppliChem, США), ДНК

© 2022 г. Федотова Т.А., Богданов И.И., Мاستиленко А.В., Ломакин А.А., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А.

* Автор для переписки:

Федотова Татьяна Александровна
кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина.

E-mail: fedotova.tatyana@list.ru

маркёр Step50 plus (Биолабмикс, Россия), наконечники для дозаторов 10, 20, 200, 500, 1000 мкл (Thermo, Финляндия); пипетка-дозатор одноканальный 10, 20, 200, 500, 1000 мкл (НЛТ, Польша), ПЦР пробирки объемом 0,2 мл (Синтол, Россия), ламинарный бокс БМБ-ii-«Ламинар-с»-1.2 (ЛамСистем, Россия), твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Латвия), микроцентрифуга Pico™ 17 (Thermo Scientific, США), мини-центрифуга-вортекс вортекс FV-2400 (BioSan, Латвия), амплификатор T100 Termal Cycler (Bio-Rad, Германия), камера для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Германия), источник питания Powerpac Basic (Bio-Rad, Германия), геледокументирующая система Bio-print CX4 Edge (Vilber, Франция), подобранные праймеры прямой (F) 5'-3' cagtcggctctgctcctct и обратный праймер (R) 3'-5' ccagcagcgtcaactaccag (ДНК-СИНТЕЗ, Россия).

Были изучены также референс-штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas stutzeri*, полученные в музее кафедры микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы (ВСЭ) Ульяновского ГАУ.

Результаты и обсуждение

Общие задачи при разработке тест-системы на основе ПЦР для молекулярно-генетической идентификации бактерий *Pseudomonas stutzeri*

Основной задачей при разработке ПЦР-тест системы является подбор праймеров, специфичных в отношении участка генома искомого микроорганизма (последовательности мишени). Для достижения данной цели необходимо выбрать ген, нуклеотидная последовательность которого встречается только в геноме искомого микроорганизма.

Затем экспериментальным путем к разработанным видоспецифичным праймерам требуется подобрать

оптимальную программу амплификации и электрофореза для качественной, специфичной постановки ПЦР.

Эта разработанная тест-система на основе ПЦР должна идентифицировать бактерии *Pseudomonas stutzeri*.

1. Разработка (подбор) видоспецифичных праймеров для идентификации *Pseudomonas stutzeri*

Чтобы разработать (подобрать) видоспецифичные праймеры, изначально нам необходимо выбрать ген-мишень бактерий *P. stutzeri* со специфической последовательностью нуклеотидов.

Поскольку ПЦР уже прочно вошла в нашу жизнь, то в целом ряде работ различных лет дается описание разработки праймеров [16, 21] и обзор необходимых для этого компьютерных программ и баз данных [6].

Выбор гена-мишени бактерии *P. stutzeri* со специфической последовательностью нуклеотидов.

Для выбора гена-мишени нами был проведен сравнительный анализ генома бактерий вида *P. stutzeri* с аннотированными прокариотическими геномами для выявления уникальных областей и фрагментов.

Для анализа специфичности генов мы использовали систему BLAST и библиотеку генов, находящуюся в открытом доступе на интернет-ресурсе <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [11].

В результате этой проделанной работы нами был отобран специфичный ген-мишень P_{szF2a_35270}. Локус имеет номер GenBank: NZ_AP024722.1 в базе данных NCBI (табл. 1).

Данный ген участвует в синтезе фермента каталазы и транслируется в следующую нуклеотидную последовательность (рис. 1).

Более детальная информация о гене представлена на рисунке 2 из базы данных NCBI.

Результаты сравнения нуклеотидной последовательности гена показали его специфичность на 93,86–99,61% для микроорганизмов вида *P. stutzeri* и несвойственность для других родов бактерий (табл. 2).

Праймерные пары подбирались к выбранному участку генома бактерий вида *P. stutzeri*, то есть гену P_{szF2a_35270}.

Таблица 1

Характеристики гена P_{szF2a} бактерий вида *P. stutzeri* из базы данных NCBI

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene	Pseudogene
Chr	-	NZ_AP024722.1	AP024722.1	4,55	64,3	4,185	12	60	4	4,283	22

```

ORIGIN
  1 atgaccttgg gctccacgcc agcgcgctt gcgctggggc tctttccgc gacctcctt
  61 gcgctgcctg cccacgctgc cccgctgacc cgcgacaatg gcgcccggg cggcaacaac
  121 cagaactccc agaccgctgg acccaacggc cgcacctgc tgcaggactg gcagctgctg
  181 cagaagctgc agcgtttcgg tcgagagcgc gtcgccgagc gcgctgtgca cccctgggt
  241 accggtgccc accgagctgt caccgcccac gaagacatct cgcacctgac cctggccaag
  301 gctcttcgaga agggcagcac cacaccgggt ttctgtgctt tctccaccgt ggtgatggc
  361 ctgcaactgc cggaaacctc gcgagaccgc cgcgcttgc ccaccaagt ctacaccgcc
  421 gatggcaact gggacctggt cggcaacaac tttccgacct tcttcatccg cgaacggctc
  481 aagttcccgg acatggtcca ctcttcaag cgggaccgc gcaccaatct ggatgagcac
  541 agccgctcct tcgacttctc ctcgaccacc cgggaagcca cccgaccct gacctgctg
  601 tactccaatc agggcactcc agccagctac cggatgatgg atggcaacgg tgtgatgctc
  661 tacaagttgc tcaacgagca gggtagaac cactatgta agttccgctg gaagagcctg
  721 caggcctga agaactcga cccgaaagag aacgagcga tgcaggcca ggaactacgc
  781 cacctgtccc gtgacctgat caccgcatc gacaacggcg actatcccaa gtgggacctg
  841 atgatcaggc tgcctcaaac gggagaccct gccaggttgc acttcatgcc gctggagccc
  901 accaagatct ggcctgactg gccgagcgc aagatcggcc agatggtgct gaacaaaaac
  961 ccggaacaata tcttcaggaa aaccgagcag gtcgcatgg cgcgcccaca cctggctcgg
  1021 ggcctcagag cgtccgagga ccgctcctg caggccctgc tgttctccta cgcgacacc
  1081 cagatgtatc gctcggctgc caaccgcatg agcctgccga tcaaccgccc gaaggtgccc
  1141 gtcaacaacg gtaaccagga cggccagctg aacgcccggc acaccaccag cagctcaac
  1201 taccagcga gccgcccga gaaaccgag gaaaccgacc gcgcccgtgc cagcaactgc
  1261 gaggtagtgc gcaccacca gcagcctatc atccagctc agcagaactc caagcagccc
  1321 ggcgatctgt atcgtcgtt cagcaagaag gaggagacc acctgatcaa caccctgggc
  1381 ggcgagctgg ccaagcggga cgaagagccc aggcacatcc tgcctgctt cttctacaag
  1441 gccgatgcca actacggcga gggcctgacc aaggtcgcca aggcagacct caagcggctc
  1501 aagacgctgc ccgccaact caaggactaa
//
    
```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность из базы данных NCBI

Pseudomonas stutzeri strain F2a chromosome, complete genome

NCBI Reference Sequence: NZ_AP024722.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS NZ_AP024722 1530 bp DNA linear CON 25-AUG-2021

DEFINITION Pseudomonas stutzeri strain F2a chromosome, complete genome.

ACCESSION NZ_AP024722 REGION: complement(3812895..3814424)

VERSION NZ_AP024722.1

DBLINK BioProject: [PRJNA224116](#)
BioSample: [SAMN00327673](#)
Sequence Read Archive: [DRR299385](#), [DRR299386](#)
Assembly: [GCF_019704535.1](#)

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Pseudomonas stutzeri

ORGANISM *Pseudomonas stutzeri*
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; Pseudomonas.

REFERENCE 1

AUTHORS Inoue, M., Hirose, Y., Tobe, R., Saito, S., Aono, R., Prakash, N.T. and Mihara, H.

TITLE Complete Genome Sequence of Pseudomonas stutzeri Strain F2a Isolated from a Seleniferous Soil

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1530)

AUTHORS Inoue, M., Hirose, Y. and Mihara, H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-JUN-2021) Contact: Masao Inoue Ritsumeikan University, College of Life Sciences; 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan URL : <https://www.mihalab.org>

COMMENT **REFSEQ_INFORMATION:** The reference sequence is identical to [AP024722.1](#).
The annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). Information about PGAP can be found here: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/annotation_prok/
Annotated by DFAST <https://dfast.dbbj.nig.ac.jp/>

##Genome-Assembly-Data-START##
Assembly Method : Newbler v. 2.8
Genome Coverage : 339x
Sequencing Technology : Illumina MiSeq
##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##
Annotation Provider : NCBI RefSeq
Annotation Date : 08/22/2021 09:20:54
Annotation Pipeline : NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)
Annotation Method : Best-placed reference protein set; GeneMarkS-2+
Annotation Software revision : 5.2
Features Annotated : Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA; repeat_region

Genes (total) : 4, 281
CDSs (total) : 4, 205
Genes (coding) : 4, 182
CDSs (with protein) : 4, 182
Genes (RNA) : 76
rRNAs : 4, 4, 4 (5S, 16S, 23S)
complete rRNAs : 4, 4, 4 (5S, 16S, 23S)
tRNAs : 60
ncRNAs : 4
Pseudo Genes (total) : 23
CDSs (without protein) : 23

Pseudo Genes (internal stop) : 3 of 23
Pseudo Genes (multiple problems) : 5 of 23
##Genome-Annotation-Data-END##
COMPLETENESS: full length.

FEATURES

Location/Qualifiers

1..1530
source
/organism="Pseudomonas stutzeri"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="F2a"
/isolation_source="soil"
/db_xref="taxon:316"
/country="India:Punjab"
/lat_lon="31.93 N 75.92 E"
/collection_date="2012"

gene
1..1530
/locus_tag="PszF2a_RS18035"
/old_locus_tag="PszF2a_35270"
/db_xref="GeneID:66822834"

CDS
1..1530
/locus_tag="PszF2a_RS18035"
/old_locus_tag="PszF2a_35270"
/EC_number="1.11.1.6"
/inference="COORDINATES: similar to AA sequence:RefSeq:WP_020305975.1"
/note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology."
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="catalase"
/protein_id="WP_221293460.1"
/db_xref="GeneID:66822834"
/translation="MTFGSTPARLALGVLSASLLALPAHAALTRDNGAPVGNQNSQ TAGPNGPTLLQVQLLQKLRFRGRRVPERVHARGTGAHGFATEDISDLT LAKVFEK GSTTPVFRVFRSTVVMHGLHSPETLRDRPGRVATKRYTADGNMLVGNPFTRIDAV KFPDMVHSFKPDRPRLTDDSRFRFLSHPEATRLTLLYSNQTGTPASVYRMDGNGV HAYKFNVEQEGTHYKFRNKSLSGLKHLDPKNEAMQCKDQYSHLSRDLITAIQNDGVP KWDLMIQV LKPEDLARDFDPLDPTKWPDPVPERKIQVMLNKNPNIQFETEQVAMA PANLVPIEPSEDRLLQGR LFYADTQMYR VGANGHSLPZNRPKVPVNVGNQDQQLNA GHTTSSVNYQPSRRNREIE TPRAVLSKLEL SGTQQASIQRFKQAGDLYRFSFKK EQTDLINTLGGELAKADDEARHILL SFFYKADANYEGLETKVAKADLKRKVTLAELK D"

ORIGIN

```

  1 atgaccttgg gctccacgcc agcgcgctt gcgctggggc tctttccgc gacctcctt
  61 gcgctgcctg cccacgctgc cccgctgacc cgcgacaatg gcgcccggg cggcaacaac
  121 cagaactccc agaccgctgg acccaacggc cgcacctgc tgcaggactg gcagctgctg
  181 cagaagctgc agcgtttcgg tcgagagcgc gtcgccgagc gcgctgtgca cccctgggt
  241 accggtgccc accgagctgt caccgcccac gaagacatct cgcacctgac cctggccaag
  301 gctcttcgaga agggcagcac cacaccgggt ttctgtgctt tctccaccgt ggtgatggc
  361 ctgcaactgc cggaaacctc gcgagaccgc cgcgcttgc ccaccaagt ctacaccgcc
  421 gatggcaact gggacctggt cggcaacaac tttccgacct tcttcatccg cgaacggctc
  481 aagttcccgg acatggtcca ctcttcaag cgggaccgc gcaccaatct ggatgagcac
  541 agccgctcct tcgacttctc ctcgaccacc cgggaagcca cccgaccct gacctgctg
  601 tactccaatc agggcactcc agccagctac cggatgatgg atggcaacgg tgtgatgctc
  661 tacaagttgc tcaacgagca gggtagaac cactatgta agttccgctg gaagagcctg
  721 caggcctga agaactcga cccgaaagag aacgagcga tgcaggcca ggaactacgc
  781 cacctgtccc gtgacctgat caccgcatc gacaacggcg actatcccaa gtgggacctg
  841 atgatcaggc tgcctcaaac gggagaccct gccaggttgc acttcatgcc gctggagccc
  901 accaagatct ggcctgactg gccgagcgc aagatcggcc agatggtgct gaacaaaaac
  961 ccggaacaata tcttcaggaa aaccgagcag gtcgcatgg cgcgcccaca cctggctcgg
  1021 ggcctcagag cgtccgagga ccgctcctg caggccctgc tgttctccta cgcgacacc
  1081 cagatgtatc gctcggctgc caaccgcatg agcctgccga tcaaccgccc gaaggtgccc
  1141 gtcaacaacg gtaaccagga cggccagctg aacgcccggc acaccaccag cagctcaac
  1201 taccagcga gccgcccga gaaaccgag gaaaccgacc gcgcccgtgc cagcaactgc
  1261 gaggtagtgc gcaccacca gcagcctatc atccagctc agcagaactc caagcagccc
  1321 ggcgatctgt atcgtcgtt cagcaagaag gaggagacc acctgatcaa caccctgggc
  1381 ggcgagctgg ccaagcggga cgaagagccc aggcacatcc tgcctgctt cttctacaag
  1441 gccgatgcca actacggcga gggcctgacc aaggtcgcca aggcagacct caagcggctc
  1501 aagacgctgc ccgccaact caaggactaa
//
    
```

Рис. 2. Основная информация о гене *PszF2a_35270* бактерий вида *P. stutzeri* (об участке генома 3,812,895..3,814,424 п.н. *P. stutzeri*) из базы данных NCBI

Сравнительный анализ гена *PszF2a_35270* бактерий вида *P. stutzeri* с аннотированными последовательностями генома прокариот (специфичность фрагмента 3,812,895..3,814,424 п.н. генома бактерии *P. stutzeri*) из базы данных NCBI

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<i>Pseudomonas stutzeri</i> F2a DNA, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2826	2990	100%	0,0	100,00%	4545686	AP024722.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain 1W1-1A chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2793	2951	100%	0,0	99,61%	4454378	CP027664.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SGAir0442 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2787	2787	100%	0,0	99,54%	4524655	CP025149.2
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain NCTC10450 genome assembly, chromosome: 1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2754	2918	100%	0,0	99,15%	4438731	LR134319.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain S116 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2732	2732	100%	0,0	98,89%	4440952	CP078509.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain YWX-1 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2710	2710	100%	0,0	98,63%	4488441	CP078087.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain DW2-1 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2704	2833	100%	0,0	98,56%	4400660	CP027543.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166. complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 4166	2693	2846	100%	0,0	98,43%	4689946	CP002622.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain ZDHY95 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2687	2857	100%	0,0	98,37%	4500524	CP063358.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain ATCC 14405 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2671	2809	100%	0,0	98,17%	4639098	CP036186.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	2649	2649	100%	0,0	97,91%	4567418	CP000304.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SLG510A3-8. complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2643	2812	100%	0,0	97,84%	4650155	CP011854.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain FDAARGOS 875 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2643	2807	100%	0,0	97,84%	4535380	CP065750.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain CGMCC 1.1803. complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2643	2807	100%	0,0	97,84%	4547930	CP002881.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain 19SMN4. complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2405	2539	100%	0,0	95,03%	4725662	CP007509.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> RCH2. complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i> RCH2	2272	2406	100%	0,0	93,46%	4575057	CP003071.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain RM2 chromosome, complete genome	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2228	2358	96%	0,0	93,86%	4614127	CP077641.1

2. Разработка (подбор) праймеров для выявления специфического участка ДНК бактерий вида *P. stutzeri*

После определения нуклеотидной последовательности, специфично содержащейся в геноме бактерий вида *P. stutzeri*, нами были выполнены работы по подбору праймерных пар для ПЦР-амплификации данного участка ДНК.

Подбор праймеров мы осуществляли с помощью Primer-blast, также находящейся в открытом доступе на интернет-ресурсе <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi> [12].

При этом учитывали основные критерии при подборе праймеров [2]:

- **Температура отжига праймеров.** Приблизительно должна быть около 60 °С для обеспечения специфичности и эффективности ПЦР. При ее

занижении возрастает вероятность возникновения ложноположительной ПЦР (снижается специфичность), а при завышении может иметь место плохая наработка целевых ампликонов, вплоть до их неоявления, что приводит к возникновению ложно-негативной ПЦР. Верхний предел температурного плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температуре выше 80 °С.

- **Близкие *Tm* праймеров.** Отличия не более, чем на 5 °С, иначе не будет синхронности работы праймеров.
- **GC-состав ампликонов.** Желательно, чтобы он находился в диапазоне от 40 до 60%. Так как более GC богатые участки с большей вероятностью могут формировать различные вторичные структуры, пре-

одолевать которые ДНК-полимеразе может быть затруднительно, вследствие чего будет снижаться эффективность ПЦР. Да и места отжига праймеров должны быть лишены вторичной структуры, мешающей спариванию праймера с матрицей.

- *3'-конец*. Предпочтительно, чтобы на нем был гуанин или цитозин, так как они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.
- *Длина праймеров*. Она оптимальна от 18 до 25 нуклеотидов. При этом каждое увеличение праймера на один нуклеотид означает снижение вероятности нахождения мест для его отжига в каком-либо геноме в 4 раза. Некая случайная последовательность длиной 16 нуклеотидов может не встретиться ни разу, а недостатком длинных праймеров может являться так называемое «фальш-праймирование».

- *Длина амплифицируемых фрагментов*. Как правило, она от 100 до 200 п.н. удовлетворяет многим требованиям. Так, не следует в праймерах (особенно в 3'-области) допускать наличие довольно протяженных гомополимерных участков (например, CCCCC), а также повторяющихся ди-, три-, тетра-нуклеотидов (например, GAGAGAGA и им подобным), поскольку это может приводить, в том числе, к проскальзыванию цепей при репликации.

На основе анализа полученных данных нами были разработаны (подобраны) следующие праймеры для проведения ПЦР: прямой (F) 5'-3' caggtcggctctgctccttct, обратный (R) 3'-5' ccagcagcgtcaactaccag. Данная пара праймеров показала высокий процент специфичности в отношении бактерий вида *P. stutzeri* (табл. 3).

Таблица 3

Специфичность разработанных праймеров в отношении бактерий *P. stutzeri* на основе последовательности гена P_{sz}F2a_35270 (данные анализа Multiple Primer Analyzer, ThermoFisher) из базы данных NCBI

Ген-мишень	Name	Sequence	T _m °C	CG%	nt	Extinction coefficient (l/(mol·cm))	Molecular weight (g/mol)	nmol	µg/OD260
P _{sz} F2a_35270	PstF1	caggtcggctctgctccttct	66,2	60,0	20	171500,0	6051,0	5,8	35,3
	PstR1	ccagcagcgtcaactaccag	66,3	60,0	20	190700,0	6056,0	5,2	31,8
Длина амплифицируемых фрагментов 179 п.н (пар нуклеотидов)									

Эта пара праймеров была нами заказана на синтез в ООО «ДНК-СИНТЕЗ».

3. Разработка оптимальных режимов циклов проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом гель-электрофореза

Отсутствие образования неспецифичных продуктов было доказано нами *in silico* с использованием программы blast и primer blast, доступных в интернет-ресурсе NCBI. Экспериментальным путем было необходимо подтвердить эти данные и подобрать оптимальный протокол для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. В целях этого, после синтеза системы праймеров ООО «ДНК-СИНТЕЗом» нами были проведены серии экспериментов ПЦР с бактериальными культурами.

В постановке ПЦР использовали экстрагированную бактериальную ДНК суточных бульонных культур референс-штаммов бактерий вида *P. stutzeri*

975, 903 и в заключительном эксперименте референс-штаммы бактерий ассоциатов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* музея кафедры микробиологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновский ГАУ им. П.А. Столыпина, в качестве матрицы в экспериментальных режимах циклов проведения ПЦР.

Постановку ПЦР проводили в 5 этапов [4, 7] с использованием необходимого лабораторного оборудования:

- Выделение (экстракция) ДНК из клеток.
- Приготовление реакционной смеси.
- Программирование температурного цикла и проведение амплификации заданного фрагмента ДНК.

- Визуализация полученных копий ДНК и регистрация результатов реакции.
- Анализ и интерпретация результатов реакции.

Выделение ДНК из клеток

Выделение ДНК из бактерий проводили при использовании набора реагентов «ПРОБА-РАПИД» для выделения ДНК по прилагаемой к нему инструкции.

Приготовление реакционной смеси

При приготовления реакционной смеси для проведения реакции амплификации использовали выделенные ДНК из бактерий на первом этапе, подобранные праймеры (прямой — короткая ДНК-затравка, комплементарная другой цепи, обратный — ограничивает зону амплифицируемого участка ДНК-ампликона) по их паспорту и комплект реагентов по его инструкции. Это ddH₂O (деионизированная вода) и 2,5-кратная полностью готовая реакционная смесь, содержащая: Sup Taq ДНК-полимеразу, которая осуществляет полимеризацию

нуклеотидов; ПЦР-буфер (Tris-HCl, KCl (pH=8,8) и MgCl₂) для функционирования Taq-полимеразы; дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ) как строительный материал для ДНК; глицерин для восстановления неудавшейся амплификации и Tween 20 для снижения ингибирования реакции.

4. Программирование температурного цикла и проведение амплификации заданного фрагмента ДНК

При подборе оптимальных режимов циклов проведения ПЦР, исходя из получаемых результатов, мы регулировали используемую концентрацию праймеров (первая концентрация праймеров P_г mix=P_{st}F1 (10 мкл)+P_{st}R1 (10 мкл)+ddH₂O (80мкл); вторая концентрация праймеров (сниженная) P_г mix(сниженная)=P_г mix (20 мкл)+ddH₂O (80 мкл)), количество циклов амплификации (40–50) и температуру отжига праймеров (от 55 до 67 °С) при запуске амплификатора (табл. 4, 5).

Таблица 4

Характеристика стадий ПЦР (Шабан Ж.Г., 2010) [7]

Стадия		Температура, °С	Экспозиция	Описание стадии
Начальная денатурация		90–95	3–10 мин	Большие двухцепочечные молекулы ДНК раскручиваются с образованием одноцепочечных молекул.
25–40 циклов	денатурация	90–95	25 с – 1 мин	Небольшие двухцепочечные ампликоны раскручиваются с образованием одноцепочечных молекул.
	отжиг	48–65	25 с – 4 мин	Праймеры прикрепляются к комплементарным фрагментам ДНК-матрицы, образуя дуплексы.
	элонгация	72	25 с – 4 мин	ДНК-полимераза прикрепляется к 3'-концу праймера, соединившегося с ДНК-матрицей, и синтезирует копию, комплементарную ДНК-матрице.
Конечная элонгация		72	5–10 мин	Образуются дуплексы ДНК.
Хранение		4	-	-

Примечание: температура отжига зависит от нуклеотидного состава праймера

Таблица 5

Экспериментальные режимы циклов проведения ПЦР

Этапы ПЦР		Эксперимент												
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11	№ 12	№ 13
1	Начальная денатурация ДНК	95 °С – 5 мин – 1 цикл												
2	Количество циклов	40	40	40	40	40	40	50	40	40	40	40	40	40
2.1	Денатурация ДНК	95 °С – 15 сек												
2.2	Отжиг праймеров 40 сек	55 °С	65 °С	62,3 °С	59,4 °С	58 °С	65 °С	65 °С	65 °С	65 °С*	65 °С*	67 °С	67 °С	67 °С
2.3	Элонгация	72 °С – 10 сек												
3	Доводка	72 °С – 2 мин – 1 цикл												

Примечание: * – снижена концентрация праймеров в данном эксперименте

5. Визуализация полученных копий ДНК и регистрация результатов реакции

Образующий высококонцентрированный раствор ампликонов ДНК прозрачен. Поэтому выявление продуктов амплификации проводили, используя электрофорез, в 2%-ном агарозном геле на разведенном 10×Tris-боратном буфере с добавлением 1% этидиум бромид (5 мкл на 100 мл), флуоресцирующего в УФ-свете. Для учета размера продуктов амплификации применяли ДНК маркер, учитывающий их размер от 50 до 1500 п.н.

Приготовление агарозного геля:

- Для получения рабочей концентрации 10-кратный Tris-боратный буфер развели в дистиллированной воде в соотношении 1:9.
- 2 г агарозы развели в 100 мл подготовленного разведенного Tris боратного электродного буфера, вскипятили, чуть остудили и добавили 5 мкл красителя ДНК (1% solution Ethidium bromide).
- Расплавленный при 65 °С гель залили в специальную форму с установленной в ней гребенкой, формирующей лунки. Когда гель застыл, гребенку вынули и извлекли полученную форму (рис. 3).

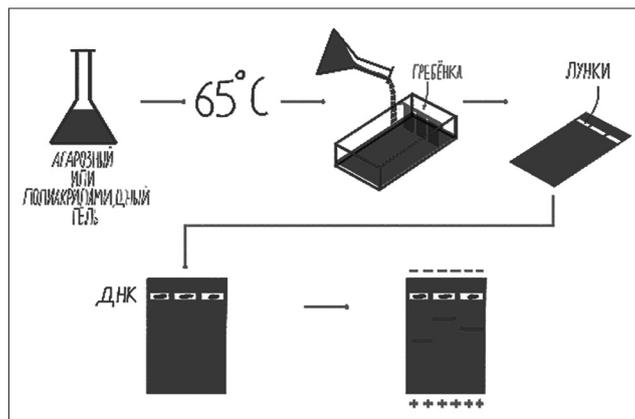


Рис. 3. Подготовка геля для горизонтального электрофореза

Проведение электрофореза ДНК в агарозном геле

Полученную форму агарозного геля ставили в камеру для электрофореза (лунками к катоду), залитую подготовленным разведенным Tris боратным буфером. Затем в лунки микропипеткой вносили по 10 мкл раствора из каждой ПЦР-пробирки после амплификации и аналогично в отдельную лунку вносили 5 мкл маркера. Камеру подключали к источнику питания и наблюдали за бегущими от электродов пузырьками.

Процесс электрофореза осуществлялся движением от катода (-) к аноду (+). Приложенное напряжение устанавливали на оптимальное значение 100 Вт, так как невысокое напряжение обеспечивает более качественное движение отрицательно заряженных частиц ДНК в геле от минуса к плюсу. Продолжительность электрофореза по времени мы подбирали в интервале от 20 до 50 минут (табл. 6), учитывая, что, как правило, он продолжается от 10 мин до 1 часа, а может быть и до 24 ч [7].

Таблица 6

Экспериментальные режимы времени электрофореза

Показатели	Эксперимент												
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10	№ 11	№ 12	№ 13
1 Напряжение (Вт)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2 Время (мин)	20	30	30	30	30	30	50	50	50	50	50	50	50

Благодаря отрицательно заряженному сахарофосфатному остову ДНК, фрагменты движутся в геле под действием электрического поля от отри-

цательного катода к положительному аноду. Более короткие молекулы делают это быстрее, чем длинные. Краситель ДНК нужен был для того, чтобы следить

за продвижением фронта проб в геле и не допустить их выхода за его пределы. Специальные интеркалирующие красители ДНК способны встраиваться в молекулу ДНК между парами оснований и флуоресцировать только после встраивания в двухнитевую молекулу ДНК.

Визуализация под ультрафиолетом

После окончания электрофореза гель вынимали из плашки и переносили на столик трансиллюминатора, чтобы увидеть расположение фрагментов под его ультрафиолетом.

Бромистый этидий, связавшийся с ДНК, флуоресцирует в УФ-свете (230 нм), давая свечение. Таким образом после проведения электрофореза мы выявляли ампликоны.

Для визуализации полученных результатов использовали гель-документирующую систему Bio_print CX4 Edge.

6. Анализ и интерпретация результатов реакции

Для оценки результатов учитывали опытные лунки и лунку с отрицательным контролем. При интерпретации

результатов ПЦР учитывали факт того, что могут быть получены как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты (табл. 7).

Ложноположительные результаты могут наблюдаться в результате контаминации при нарушении правил проведения ПЦР. Ложноотрицательные результаты могут наблюдаться в результате снижения чувствительности ПЦР при ингибировании реакции компонентами биологических образцов.

Анализ результатов ПЦР

Таблица 7

Образцы	Све
---------	-----

Отрицательный контроль	должны отсутствовать
Положительный контроль	должны присутствовать
Опытные образцы положительные	присутствуют
Опытные образцы отрицательные	отсутствуют

Учитывая и анализируя все полученные в ходе исследований результаты реакций ПЦР при корректировках концентрации праймеров, режимов амплификации и режимов

электрофореза в 12-м и 13-м экспериментах, мы получили ожидаемые данные (рис. 4). Результаты электрофореза по 12-му эксперименту представлены на рисунке 5.

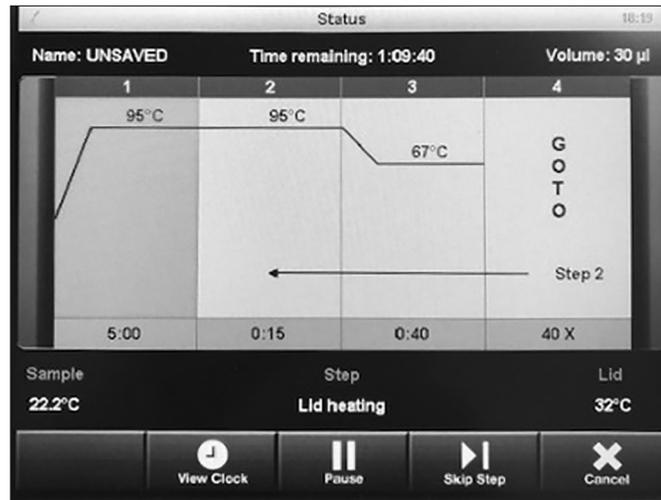


Рис. 4. Режимы этапов ПЦР в 12-м эксперименте

В результате выполнения исследований мы выявили продукты реакции, соответствующие ожидаемым (табл. 8), что свидетельствует о правильном прохождении реакций, о возможности применения выбранных праймеров в ПЦР-системе и позволяет выявить ДНК бактерий *P. stutzeri* методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом гель-электрофореза. При этом продукт реакции имеет длину 179 п.н., которую мы определяли по ДНК-маркеру согласно прилагаемой к нему инструкции.

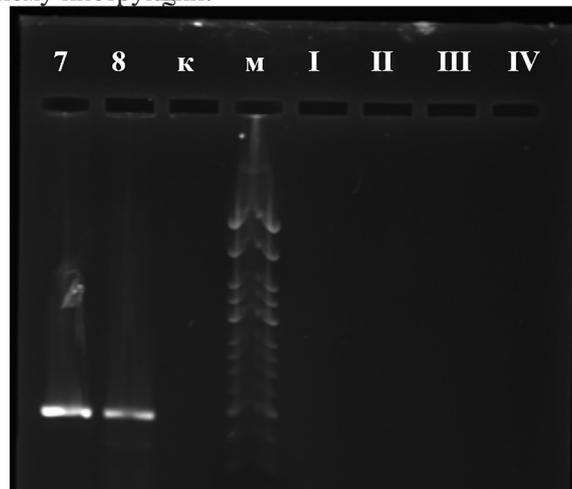


Рис. 5. Электрофореграмма определения специфичности праймеров. Лунки: 1 – *P. stutzeri* 975 (7), 2 – *P. stutzeri* 903 (8), 3 – отрицательный контроль ddH₂O (к), 4 – ДНК-маркер (м), 5 – *P. aeruginosa* (I), 6 – *E. coli* (II), 7 – *Y. enterocolitica* (III), 8 – *Staphylococcus aureus* (IV)

Таблица 8

3	ddH ₂ O контроль
4	ДНК-маркер
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	<i>Pseudomonas putida</i>
7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
8	<i>Yersinia enterocolitica</i>
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	<i>Escherichia coli</i>
11	<i>Proteus mirabilis</i>
12	<i>Aeromonas hydrophila</i>
13	<i>Citrobacter freundii</i>
14	<i>Aeromonas hydrophila</i>
15	<i>Citrobacter freundii</i>
16	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
17	<i>Staphylococcus aureus</i>

Прохождение ПЦР-реакций на различных

образцах

Примечание: «-» — отрицательный результат, «+» — по-

№	Образцы ДНК	Образующиеся продукты реакции	
		179 п.н.	специфика
1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 975	+	+
2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 903	+	+

ложительный результат

Таким образом, опытным путем на отрицательных контрольных образцах (вода) и образцах ДНК, выделенных от референс-штаммов бактерий *P. stutzeri* 903, 975 и их ассоциатов (референс-штаммы бактерий других видов и родов), было установлено, что разработанные нами праймеры, подобранные режимы амплификации и электрофореза верны и позволяют специфично осуществлять ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом гель-электрофореза.

Полученные результаты дают возможность идентифицировать бактерии вида *P. stutzeri* и лягут в основу подбора зонда для РВ-ПЦР.

Заключение

В результате выполненных исследований нами был проведен подбор гена-мишени, P_{szF2a_35270} бактерий *P. stutzeri* со специфической последовательностью нуклеотидов и праймеров P_{stF1} caggctcgggtctgctcctct, P_{stR1} ccagcagcgtcaactaccag, специфичных в отношении к выбранному участку генома бактерий вида *P. stutzeri*, составлена оптимальная программа амплификации и электрофореза для качественной, специфичной постановки ПЦР. Эта разработанная тест-система на основе ПЦР для молекулярно-генетической идентификации бактерий *P. stutzeri* была протестирована, подтвердив свою способность идентифицировать бактерии *Pseudomonas stutzeri* и отделить их от ассоциатов.

Исследование проводилось при поддержке проекта Российского фонда фундаментальных исследований №19-416-730004.

Литература

1. Богатыренко Е.А. Характеристика культивируемых гетеротрофов микробного сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*: специальность 03.02.08 «Экология (по отраслям)»: дисс. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2013. — 128 с.
2. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Малеев Г.В., Алексеев Я.И., Зубов В.В., Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Матнязов Р.Т., Сахабутдинова А.Р., Никонов Ю.М., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора // Биомика. — 2019. — Т. 11(1). — С. 23–70.
3. Перушкина Е.В., Шагинурова Г.И., Сироткин А.С. и др. Биодegradация серусодержащего полимера в про-

цессе очистки сточных вод химических производств // Химическая промышленность сегодня. — 2008. — № 7. — С. 42–49.

4. Ребриков Д.В., Саматов Г.А. ПЦР «в реальном времени». — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. — 223 с.
5. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. АН УССР, Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного. — Киев: Наукова думка, 1990. — 264 с.
6. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) // Биомика. — 2016. — Т. 8. — № 3. — С. 215–238.
7. Шабан Ж.Г. и др. Методы исследования в микробиологии: учеб.-метод. пособие. — Минск: БГМУ, 2010. — 124 с.
8. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. — New York: John Wiley & Sons, Inc., 2019. doi: 10.1002/9781118960608.
9. Goetz A., Yu V.L., Hanchett J.E., Rihs J.D. *Pseudomonas stutzeri* bacteremia associated with hemodialysis // Arch. Intern. Med. — 1983. — Vol. 143(10). — P. 1909–1912.
10. Graupner S., Wackernagel W. *Pseudomonas stutzeri* has two closely related pilA genes (Type IV pilus structural protein) with opposite influences on natural genetic transformation // J. Bacteriol. — 2001. — Vol. 183(7). — P. 2359–2366.
11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>.
13. Hubálek Z., Páčová Z., Halouzka J., Sedláček I., Dlouhý M., Honza M. Selective isolation of *Pseudomonas stutzeri* from vertebrate faeces on Rambach agar // Zentralbl. Bacteriol. — 1998. — Vol. 288. — No. 3. — P. 343–349.
14. Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., García-Valdés E., Palleroni N.J. Biology of *Pseudomonas stutzeri* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2006. — Vol. 70(2). — P. 510–547.
15. Lapage S.P., Hill L.R., Reeve J.D. *Pseudomonas stutzeri* in pathological material // J. Med. Microbiol. — 1968. — Vol. 1(2). — P. 195–202.
16. Lima A.O.S., Garcês S.P.S. Intrageneric primer design: Bringing bioinformatics tools to the class // Biochemistry and Molecular Biology Education. — 2006. — Vol. 34(5). — P. 332–337.
17. Muslim S.N., Hasan A.M. and Mahdi D.N.Z. Antibiofilm and antiadhesive properties of pectinase purified from *Pseudomonas stutzeri* isolated from spoiled orange // Advances in Environmental Biology. — 2016. — Vol. 10(11). — P. 91–98.
18. Noble R.C., Overman S.B. *Pseudomonas stutzeri* infection: A review of hospital isolates and a review of the literature // Diagn. Microbiol Infect. — 1994. — Vol. 19(1). — P. 51–56.
19. Park S.W., Back J.H., Lee S.W., Song J.H., Shin C.H., Kim G.E., Kim M.J. Successful antibiotic treatment of *Pseudomonas stutzeri*-induced peritonitis without peritoneal

- dialysis catheter removal in continuous ambulatory peritoneal dialysis // *Kidney Res. Clin. Pract.* – 2013. – Vol. 32(2). – P. 81–83.
20. Patel M., Patel H.M., Vohra N., Dave S. Complete genome sequencing and comparative genome characterization of the lignocellulosic biomass degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* MP4687 from cattle rumen // *Biotechnol. Rep. (Amst.)*. – 2020. – Vol. 28. – Art. e00530. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00530.
21. Robertson A.L., Phillips A.R. Integrating PCR theory and bioinformatics into a research-oriented primer design exercise // *CBE Life Sci. Educ.* – 2008. – Vol. 7(1). – P. 89–95.
22. Shalabi A., Ehrlich T., Schäfers H.J., Becker S.L. Infective endocarditis caused by *Pseudomonas stutzeri* in a patient with Marfan syndrome: Case report and brief literature review // *IDCases*. – 2017. – Vol. 10. – P. 22–25.
23. Van Niel C.B., and Allen M.B. A note on *Pseudomonas stutzeri* // *J. Bacteriol.* – 1952. – Vol. 64. – P. 413–422.

References

1. Bogatyrenko YeA. Kharakteristika kul'tiviruyemykh geterotrofov mikrobnogo soobshchestva kishchnika dal'nevostochnogo tre-panga *Apostichopus japonicus*: spetsial'nost' 03.02.08 «Ekologiya (po otraslyam)»: diss ... kand biol nauk. Vladivostok, 2013: 128 (in Russian).
2. Garafutdinov RR, Baymiyev AnKh, Maleyev GV, Alekseyev YaI, Zubov VV, Chemeris DA, Kir'yanova OYu, Gubaydullin IM, Matniyazov RT, Sakhabutdinova AR, Nikonorov YuM, Kuluyev BR, Baymiyev AlKh, Chemeris AV. Raznoobraziye praymerov dlya PTSR i printsipy ikh podbora. *Biomika* 2019; 11(1):23–70 (in Russian).
3. Perushkina YeV, Shaginurova GI, Sirotkin AS i dr. Biodegradatsiya serusoderzhashchego polimera v protsesse ochistki stochnykh vod khimicheskikh proizvodstv. *Khimicheskaya promyshlennost' segodnya* 2008; 7:42–49 (in Russian).
4. Rebrikov DV, Samatov GA. PTSR «v real'nom vremeni. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy, 2009: 223 (in Russian).
5. Smirnov VV, Kiprianova YeA. Bakterii roda *Pseudomonas*. AN USSR, In-t mikrobiologii i virusologii im DK Zabolotnogo. Kiyev: Naukova dumka, 1990: 264 (in Russian).
6. Chemeris DA, Kir'yanova OYu, Gubaydullin IM, Chemeris AV. Dizayn praymerov dlya polimeraznoy tsepnoy reaktsii (kratkiy obzor komp'yuternykh programm i baz dannykh). *Biomika* 2016; 8(3):215–238 (in Russian).
7. Shaban ZhG i dr. Metody issledovaniya v mikrobiologii: ucheb-metod posobiye. Minsk: BGMU, 2010: 124 (in Russian).
8. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2019. doi: 10.1002/9781118960608.
9. Goetz A, Yu VL, Hanchett JE, Rihs JD. *Pseudomonas stutzeri* bacteremia associated with hemodialysis. *Arch Intern Med* 1983; 143(10):1909–1912.
10. Graupner S, Wackernagel W. *Pseudomonas stutzeri* has two closely related pilA genes (Type IV pilus structural protein) with opposite influences on natural genetic transformation // *J Bacteriol* 2001; 183(7):2359–2366.
11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>.
13. Hubálek Z, Páčová Z, Halouzka J, Sedláček I, Dlouhý M, Honza M. Selective isolation of *Pseudomonas stutzeri* from vertebrate faeces on Rambach agar. *Zentralbl Bacteriol* 1998; 288(3):343–349.

14. Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiol Mol Biol Rev 2006; 70(2):510–547.
15. Lapage SP, Hill LR, Reeve JD. *Pseudomonas stutzeri* in pathological material. J Med Microbiol 1968; 1(2):195–202.
16. Lima AOS, Garcês SPS. Intrageneric primer design: Bringing bioinformatics tools to the class. Biochemistry and Molecular Biology Education 2006; 34(5):332–337.
17. Muslim SN, Hasan AM and Mahdi DNZ. Antibiofilm and antiadhesive properties of pectinase purified from *Pseudomonas stutzeri* isolated from spoiled orange. Advances in Environmental Biology 2016; 10(11):91–98.
18. Noble RC, Overman SB. *Pseudomonas stutzeri* infection: A review of hospital isolates and a review of the literature. Diagn Microbiol Infect 1994; 19(1):51–56.
19. Park SW, Back JH, Lee SW, Song JH, Shin CH, Kim GE, Kim MJ. Successful antibiotic treatment of *Pseudomonas stutzeri*-induced peritonitis without peritoneal dialysis catheter removal in continuous ambulatory peritoneal dialysis. Kidney Res Clin Pract 2013; 32(2):81–83.
20. Patel M, Patel HM, Vohra N, Dave S. Complete genome sequencing and comparative genome characterization of the lignocellulosic biomass degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* MP4687 from cattle rumen. Biotechnol Rep (Amst) 2020; 28:e00530. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00530.
21. Robertson AL, Phillips AR. Integrating PCR theory and bioinformatics into a research-oriented primer design exercise. CBE Life Sci Educ 2008; 7(1):89–95.
22. Shalabi A, Ehrlich T, Schäfers HJ, Becker SL. Infective endocarditis caused by *Pseudomonas stutzeri* in a patient with Marfan syndrome: Case report and brief literature review. IDCases 2017; 10:22–25.
23. Van Niel CB, and Allen MB. A note on *Pseudomonas stutzeri*. J Bacteriol 1952; 64:413–422.

DEVELOPMENT OF A PCR-BASED TEST SYSTEM FOR MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF *PSEUDOMONAS STUTZERI* BACTERIA

T.A. FEDOTOVA¹, I.I. BOGDANOV¹, A.V. MASTILENKO², A.A. LOMAKIN¹, L.P. PULCHEROVSKAYA¹, D.A. VASILYEV¹

¹ Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk,
² LLC «TestGen»

The article is devoted to the development of a PCR-based test system for the molecular genetic identification of *Pseudomonas stutzeri* bacteria. This is relevant at the moment, in view of the fact that the bacteria of the *P. stutzeri* species have been little studied, there are difficulties in their identification, and in the scientific literature there are no data on PCR for *P. stutzeri* bacteria. In the course of the study, primers specific to the genome region of the desired microorganism were selected, and the optimal amplification and electrophoresis program was experimentally selected for them for high quality, specific PCR. This developed PCR-based test system for molecular genetic identification of *P. stutzeri* has been tested and confirmed to be able to identify *P. stutzeri* bacteria from their associates.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas*, polymerase chain reaction, PCR, molecular genetic identification, primer, gene, nucleotide sequence.

Address:

Fedotova T.A.
Department of microbiology, virology,
epizootology and veterinary and sanitary expertise,
Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin.

E-mail: fedotova.tatyana@list.ru

Для цитирования:

Федотова Т.А., Богданов И.И., Мاستиленко А.В., Ломакин А.А., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А. Разработка тест-системы на основе ПЦР для молекулярно-генетической идентификации бактерий *Pseudomonas stutzeri*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(2):42–55.

For citation:

Fedotova T.A., Bogdanov I.I., Mastilenko A.V., Lomakin A.A., Pulcherovskaya L.P., Vasilyev

D.A. Development of a PCR-based test system for molecular genetic identification of *Pseudomonas stutzeri* bacteria. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(2):42–55 (in Russian).

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ ВИДА *PSEUDOMONAS STUTZERI* И ИХ АССОЦИАТОВ К РАЗЛИЧНЫМ КРАСИТЕЛЯМ

Т.А. ФЕДОТОВА*, И.И. БОГДАНОВ, Д.А. ВАСИЛЬЕВ, Л.П. ПУЛЬЧЕРОВСКАЯ

Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Ульяновск

Статья посвящена изучению чувствительности бактерий вида *Pseudomonas stutzeri* и их ассоциатов к красителям, таким как бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый, фуксин основной, конго красный. Полученные данные могут быть использованы для разработки под бактерии вида *P. stutzeri* селективной и дифференциально-диагностической питательной среды, необходимой для создания схемы выделения, индикации и идентификации этих бактерий из патологического материала и объектов внешней среды. Это актуально на данный момент, так как бактерии вида *P. stutzeri* мало изучены, есть сложности с их выявлением, а многие красители входят в состав широко применяемых в микробиологической практике дифференциально-диагностических сред. С учетом полученных результатов определили, что основной фуксин 0,02 г, 0,05 г на 100 мл и конго красный 0,01 г, 0,03 г, 0,05 г на 100 мл в качестве ингибирующего компонента разработанной селективно-дифференциально-диагностической питательной среды под *P. stutzeri* использовать не следует. Изучение чувствительности *P. stutzeri* к этим красителям в больших или меньших концентрациях относительно изученных концентраций нецелесообразно. Возможно дополнительно рассмотреть и изучить для этой цели краситель кристаллический фиолетовый в концентрации больше, чем 0,0002 г на 100 мл, и краситель бриллиантовый зеленый в концентрации меньше, чем 0,001 г на 100 мл.

Ключевые слова: *Pseudomonas stutzeri*, псевдомонады, красители, бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый, фуксин основной, конго красный.

Введение

Во введении к предыдущей нашей статье «Разработка тест-системы на основе ПЦР для молекулярно-генетической идентификации бактерий *Pseudomonas stutzeri*» достаточно полно изложены актуальность и недостаточная изученность этого вида бактерий. Между тем имеется еще ниша, в рамках которой возможна разработка определенного востребованного аспекта, связанного с исследованием *P. stutzeri*.

Прежде всего, это касается более широкого использования разных питательных сред и целенаправленного изучения чувствительности указанного вида к различным красителям.

Цель работы — изучение чувствительности бактерий *P. stutzeri* и их ассоциатов к различным красителям. Для этого были использованы красители бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый, фуксин основной и конго красный.

Материалы и методы

Работа была выполнена на референс-штаммах бактерий *P. stutzeri*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* 128 нетипичная, *Pseudomonas aeruginosa* типичная, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, полученных из музея кафедры микробиологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ.

Использовались в работе культуральная среда [GRowth Medium] — ГРМ бульон (ФБУН ГНЦПМиБ, Россия, г. Оболensk), ГРМ агар (ФБУН ГНЦПМиБ, Россия, г. Оболensk), бриллиантовый зелёный — золотисто-зелёный порошок (ООО «Эко-тек», Россия, г. Москва), кристаллический фиолетовый — порошок темного зеленого/коричневого окраса (АО «ЛенРеактив», Россия, г. Санкт Петербург), конго красный-красно-коричневый порошок (фасовка ООО «Диаэм», Россия, г. Москва), фуксин основной (АО «ЛенРеактив», Россия, г. Санкт-Петербург), дистиллированная вода, лабораторные весы, сушижаровой шкаф, дистиллятор (Liston), плитка электрическая, автоклав (ГК-100-3), термостат (ТС-80М-2), термо-

© 2022 г. Федотова Т.А., Богданов И.И., Васильев Д.А., Пульчеровская Л.П.

* Автор для переписки:

Федотова Татьяна Александровна

кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина.

E-mail: fedotova.tatyana@list.ru

метр, ультрафиолетовая лампа марки «Phillips» с длиной волны 253 нм, спиртовка, петля бактериологическая, лабораторная стерильная посуда.

Оценку чувствительности бактерий вида *Pseudomonas stutzeri* и их ассоциатов к красителям бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый, фуксин основной и конго красный проводили визуально, посредством анализа в течение 72 ч, используя критерий отсутствия или наличия роста их колоний при культивировании на ГРМ агаре с различными концентрациями внесенных туда красителей при температуре 37 °С.

Результаты и обсуждение

Согласно прописи, были приготовлены ГРМ бульон, ГРМ агар и ГРМ агары с добавлением красителей бриллиантовый зеленый 0,001 г на 100 мл, 0,005 г на 100 мл, кристаллический фиолетовый 0,0001 г на 100 мл, 0,0002 г на 100 мл, фуксин основной 0,02 г на 100 мл, 0,05 г на 100 мл, конго красный 0,01 г на 100 мл, 0,03 г на 100 мл и 0,05 г на 100 мл.

Эти подготовленные среды были проавтоклавируются при температуре 112 °С. В стерильных условиях были разлиты: ГРМ бульон — по пробиркам, а ГРМ агар — по чашкам Петри. ГРМ агары были оставлены на сутки застывать и подсыхать при комнатной температуре. В остывшие ГРМ бульоны были засеяны все исследуемые референс-штаммы и получены их суточные культуры.

Далее эти суточные культуры были засеяны на чистые ГРМ агары в качестве контроля и на ГРМ агары, содержащие в разных концентрациях бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый, фуксин основной и конго красный. Применялся метод истощающего штриха с целью получения изолированных колоний. Такой подход использовался для изучения их роста под действием красителей как ингибирующих компонентов.

Посевы были культивированы при 37 °С в течение 72 часов, с фиксацией результатов каждые 24 часа. В качестве контроля параллельно в тех же условиях культивировались незасеянные чашки Петри с чистым ГРМ агаром и ГРМ агаром, содержащим аналогичные концентрации всех используемых в исследовании красителей. Рост бактерий всех исследуемых референс-штаммов наблюдался на ГРМ бульонах и контрольных ГРМ агарах с первых суток культивирования при температуре 37 °С.

На незасеянных, контрольных чашках Петри с чистым ГРМ агаром и ГРМ агарами, содержащими красители бриллиантовый зеленый, кристаллический

фиолетовый, фуксин основной и конго красный, не наблюдался рост бактериальных колоний на протяжении 72 ч культивирования при температуре 37 °С.

Бриллиантовый зеленый — синтетический анилиновый краситель трифенилметанового ряда. Технические названия и его синонимы [4] — основной зелёный, малахитовый зелёный, основной ярко-зелёный, китайская зелень, смарагдовая зелень, этиленовая зелень. Он был отобран нами в работу, так как является одним из самых быстродействующих и высокоактивных антисептиков [7]. Активен он в отношении грамположительных бактерий [7, 15] и оказывает фунгицидное действие относительно некоторых патогенных грибов [7, 12]. Меньшее действие он проявляет против грам-отрицательных микроорганизмов. Он неэффективен против бактериальных спор и кислотоустойчивых бактерий [12]. В научной литературе найдены данные о низкой чувствительности (менее 20%) к нему бактерий вида *P. stutzeri*. Известно также, что рассматриваемый препарат используется в виде спиртовых или водных растворов для обработки кожи при ее заболеваниях и повреждениях [9]. В белковой среде (кровь, гной) его противомикробное действие слабеет [6, 9]. Бриллиантовый зеленый широко применяется в фармацевтике и медицине в роли антисептического лекарственного средства, для обеззараживания свежих послеоперационных и посттравматических рубцов, обработки пуповины новорождённых, порезов, ссадин и иных нарушений целостности кожных покровов, при лечении гнойно-воспалительных процессов кожи [15] и для обеззараживания медицинских инструментов [11, 15]. В микробиологии используется как краситель, например, при анализе вод на наличие фекальных микроорганизмов, для приготовления агаровой питательной среды с бриллиантовым зелёным, которая предназначена для пересева культур и идентификации бактерий рода *Salmonella* [2]. В промышленности применяется как краситель для бумаги, древесины, шёлка, хлопка, для изготовления фаналевых лаков [3, 4]. В сельском хозяйстве ограниченно используется в качестве избирательного гербицида и для ограничения роста усиков земляники и клубники [1] как рН-индикатор с переходом от желтого к зеленому [5]. В рыбоводстве его задействуют для борьбы с некоторыми заболеваниями рыб и др.

Бактериальные колонии референс-штаммов *P. stutzeri* 4792, 3503, 3506, 4904 оказались неустойчивыми к красителю бриллиантовый зеленый 0,001 г на 100 мл и 0,005 г на 100 мл, как и основная масса остальных

ассоциатов, за исключением *Pseudomonas aeruginosa* типичной.

Следовательно, использовать бриллиантовый зеленый 0,001 г на 100 мл и 0,005 г на 100 мл как ингибирующий компонент конструируемой селективной среды для *P. stutzeri* нецелесообразно. При этом возможно дальнейшее рассмотрение и изучение с этой целью его в концентрации меньше, чем 0,001 г, на 100 мл.

Кристаллический фиолетовый — органический основной анилиновый краситель, одна из самых распространенных форм метилвиолета. Его синонимы — генцианвиолет, кристаллвиолет, метилвиолет. Он имеет вид кристаллической массы от темно-зеленого до коричневого окраса с характерным металлическим отблеском. Его мы взяли в работу ввиду того, что он обладает антибактериальным, противогрибковым и антигельминтным действием [14]. Ранее он был важен как местное антисептическое средство. Кристаллический фиолетовый выполняет роль селективного фактора, уменьшая кокковую флору. Создает бактериостаз у грамположительных бактерий. Применяется, в частности, для идентификации грамотрицательных бактерий, поскольку он действует бактериостатически на грамположительные виды [10].

К красителю кристаллический фиолетовый в концентрациях 0,0001 г на 100 мл и 0,0002 г на 100 мл бактериальные колонии референс-штаммов *P. stutzeri* 4792, 3503, 3506, 4904 оказались устойчивыми, как и все остальные исследуемые референс-штаммы ассоциатов.

Поэтому использовать кристаллический фиолетовый 0,0001 г на 100 мл и 0,0002 г на 100 мл как ингибирующий компонент конструируемой селективной среды для *P. stutzeri* нецелесообразно.

Возможно дальнейшее изучение устойчивости референс-штаммов *P. stutzeri* 4792, 3503, 3506, 4904 и их ассоциатов к концентрации красителя кристаллический фиолетовый больше, чем 0,0002 г на 100 мл.

Конго красный (синоним — конгорот) — азокраситель, кислотно-основной индикатор. Представляет собой красно-коричневый порошок, растворимый в воде и спирте. Растворы конго красного в кислой среде синие, а в щелочной и нейтральной — красные [9]. Его используют как индикатор в химическом анализе, в микроскопических исследованиях. Он используется также в виде спиртового, водного или аммиачного раствора для окрашивания клеточной оболочки грибов, бактерий (самостоятельно, либо в сочетании с генциановым фиолетовым). Конго красный активно применяется в гистологии для выявления амилоида [11]. Кроме

этого, «классического» применения, его используют в десятках других процедур окрашивания в зоологии беспозвоночных, ботанических исследованиях, цитологии человека и животных [13].

Информации в научной литературе о наличии антимикробного действия у красителя конго красный не найдено и в питательные среды он вносится в качестве индикатора, например, 0,005 г/л. Поэтому мы использовали его концентрацию в 10 раз больше той, которую закладывают в питательные среды в качестве индикатора.

К красителю конго красный 0,01 г, 0,03 г и 0,05 г на 100 мл бактериальные колонии референс-штаммов *P. stutzeri* 4792, 3503, 3506, 4904 оказались устойчивыми, как и все остальные исследуемые референс-штаммы ассоциатов.

По этим причинам использовать конго красный как ингибирующий компонент конструируемой селективной среды для *P. stutzeri* нецелесообразно.

Фуксин — краситель в виде зеленых кристаллов с металлическим блеском. Имеет красный цвет. Синонимы — маджента, основной фиолетовый, гидрохлорид, розанилин гидрохлорид, смесь гидрохлоридов розанилина и парарозанилина, фуксин (Basic Fuchsin basic magenta). Его мы использовали по причине того, что он является противогрибковым веществом и, аналогично другим анилиновым красителям — бриллиантовому зеленому («зеленка») и метиленовому синему («синька»), — проявляет активность в отношении стафилококков. Поэтому он включен в состав некоторых антисептиков [8]. В литературе найдены данные о вариабельности реакции на него бактерий вида *P. stutzeri*. Применяют его, окрашивая бактерии для их наблюдения под микроскопом и гистологических исследований.

Основной фуксин может быть использован для простых и дифференциальных методов окрашивания. Как правило, его используют в сфере окрашивания нетекстильных материалов (бумаги, кожи, дерева и пр.), при изготовлении цветных карандашей, лаков для полиграфии, чернил [8].

Частично устойчивыми оказались бактериальные колонии референс-штаммов *P. stutzeri* 4792, 3503, 3506, 4904 к красителю фуксин основной в концентрации 0,02 г на 100 мл и большей частью чувствительны к фуксину основному в концентрации 0,05 г на 100 мл. Практически все остальные референс-штаммы их ассоциатов проявили устойчивость к данному красителю.

Исходя из этого, использовать фуксин основной как ингибирующий компонент конструируемой селективной среды для *P. stutzeri* также нецелесообразно.

Заключение

Учитывая результаты, полученные в ходе данной работы по изучению чувствительности бактерий вида *P. stutzeri* и их ассоциатов к красителям, используемым в этом исследовании, сделаны выводы о том, что применять краситель фуксин основной и конго красный как ингибирующий компонент конструируемой селективной и дифференциально-диагностической питательной среды под *P. stutzeri* нецелесообразно, как в принципе и изучение чувствительности исследуемых бактерий к их иным меньшим или большим концентрациям.

Возможно дальнейшее рассмотрение и изучение с этой целью красителя кристаллического фиолетового в концентрации больше, чем 0,0002 г на 100 мл, и красителя «бриллиантовый зеленый» в концентрации меньше, чем 0,001 г на 100 мл.

Эта работа осуществлялась в связи с необходимостью подбора ингибирующих компонентов для конструируемой селективной и дифференциально-диагностической питательной среды под *P. stutzeri*.

Исследование проводилось при поддержке проекта Российского фонда фундаментальных исследований №19-416-730004.

Литература

1. Ассортимент ядохимикатов. Электронный ресурс. www.znaytovar.ru. Дата обращения: 30 января 2022.
2. Бриллиантовый зелёный агар. — ООО «Синтэкс». Электронный ресурс. www.npfsyntex.ru. Дата обращения: 30 января 2022.
3. Венкатараман К. Химия синтетических красителей. — Л., 1975. — Т. 4. — С. 115.
4. Вредные вещества в промышленности. — 1976. — Т. II. — С. 515–516.
5. Никольский Б.П., Григоров О.Н., Позин М.Е. и др. Справочник химика. Т. 4. — М.: Госхимиздат, 1963. — С. 353.
6. Описание вещества «Бриллиантовый зелёный» (*Viride nitens*): инструкция, применение, противопоказания и формула. https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_3463.htm.
7. Падейская Е.И. Бриллиантовый зелёный / Большая медицинская энциклопедия: в 30 т. Гл. ред. Б.В. Петровский. 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия, 1976. — Т. 3: Беклемишев — Валидол. — С. 1125–1126.
8. Фуксин кислый. http://www.antchemistry.ru/catalog_price.php?p=1160. Электронный ресурс. Дата обращения: 30 января 2022.

9. Химический энциклопедический словарь / Гл. ред. Кнунянц И.Л. — М.: Советская энциклопедия, 1983. — 792 с.
10. Черчман Дж. Избирательное бактерицидное действие генцианвиолета // Журнал экспериментальной медицины. — 1912. — Т. 16(2). — С. 221–247, листы 21–31.
11. Bennhold H. Eine spezifische Amyloidfaerbung mit Kongorot. — Muenchen medizinischer Wochenschrift. — 1922. — No. 2. — P. 1537–1538.
12. Brilliant Green. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 12449. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Brilliant-green>.
13. CONN'S Biological Stains. 10th edition, 2008. — P. 132–134.
14. Docampo R., Moreno S.N. The metabolism and mode of action of gentian violet // Drug Metab. Rev. — 1990. — Vol. 22(2–3). — P. 161–178.
15. Narat J.K. Brilliant green: A clinical study of its value as a local antiseptic // Annals of Surgery. — 1931. — Vol. 94(6). — P. 1007–1012.

References

1. Assortiment yadokhimikatov. Elektronnyy resurs. www.znaytovar.ru. Data obrashcheniya: 30 yanvarya 2022 (in Russian).
2. Brilliantovyy zelonyy agar. ООО «Синтэкс». Elektronnyy resurs. www.npfsyntex.ru. Data obrashcheniya: 30 yanvarya 2022 (in Russian).
3. Venkataraman K. Khimiya sinteticheskikh krasiteley. Leningrad, 1975; 4:115. (in Russian).
4. Vrednyye veshchestva v promyshlennosti, 1976; II:515–516 (in Russian).
5. Nikol'skiy BP, Grigorov ON, Pozin MYe i dr. Spravochnik khimika. Tom 4. Moscow: Goskhimizdat, 1963: 353 (in Russian).
6. Opisanie veshchestva «Brilliantovyy zelonyy» (*Viride nitens*): instruktsiya, primeneniye, protivopokazaniya i formula. https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_3463.htm (in Russian).
7. Padeyskaya YeI. Brilliantovyy zelonyy. Bol'shaya meditsinskaya entsiklopediya: v 30 t. Gl red BV Petrovskiy. 3-ye izd. Moscow: Sovetskaya entsiklopediya. Tom 3: Beklemishev — Validol 1976:1125–1126 (in Russian).
8. Fuksin kislyy. http://www.antchemistry.ru/catalog_price.php?p=1160. Elektronnyy resurs. Data obrashcheniya: 30 yanvarya 2022 (in Russian).
9. Khimicheskiy entsiklopedicheskiy slovar'. Gl red Knunyants IL. Moscow: Sovetskaya entsiklopediya, 1983: 792 (in Russian).
10. Cherkhman Dzh. Izbiratel'noye bakteritsidnoye deystviye gentsianvioleta. Zhurnal eksperimental'noy meditsiny 1912; 16(2):221–247, listy 21–31 (in Russian).
11. Bennhold H. Eine spezifische Amyloidfaerbung mit Kongorot. Muenchen medizinischer Wochenschrift 1922; 2:1537–1538.

12. Brilliant Green. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 12449. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Brilliant-green>.
13. CONN'S Biological Stains. 10th edition, 2008: 132–134.
14. Docampo R, Moreno SN. The metabolism and mode of action of gentian violet. *Drug Metab Rev* 1990; 22(2–3):161–178.
15. Narat JK. Brilliant green: A clinical study of its value as a local antiseptic. *Annals of Surgery* 1931; 94(6):1007–1012.

STUDY OF THE SENSITIVITY OF BACTERIA OF THE SPECIES *PSEUDOMONAS STUTZERI* AND THEIR ASSOCIATES TO VARIOUS DYES

T.A. FEDOTOVA, I.I. BOGDANOV, D.A. VASILYEV, L.P. PULCHEROVSKAYA

Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk

The article is devoted to the study of the sensitivity of bacteria of the species *Pseudomonas stutzeri* and their associates to dyes such as brilliant green, crystal violet, basic magenta, Congo red. The data obtained can be used to develop a selective and differential diagnostic nutrient medium for *P. stutzeri* species, necessary to create a scheme for isolating, indicating and identifying these bacteria from pathological material and environmental objects. This is relevant at the moment, since the bacteria of the species *P. stutzeri* are little studied, there are difficulties in their identification, and many dyes are part of differential diagnostic media widely used in microbiological practice. Taking into account the results obtained, it was determined that the basic fuchsin is 0.02 g, 0.05 g per 100 ml. and Congo red 0.01 g, 0.03 g, 0.05 g per 100 ml should not be used as an inhibitory component of the developed selective differential diagnostic nutrient medium for *P. stutzeri*. It is not reasonable to study the sensitivity of *P. stutzeri* to these dyes at higher or lower concentrations relative to the studied concentrations. It is possible to further consider and study for this purpose the dye crystal violet at a concentration of more than 0.0002 g per 100 ml and dye brilliant green at a concentration of less than 0.001 g per 100 ml.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas*, dyes, brilliant green, crystal violet, basic magenta, Congo red.

Address:

Fedotova T.A.

Department of microbiology, virology,
epizootology and veterinary and sanitary expertise,
Ulyanovsk State Agrarian University named after
P.A. Stolypin, Ulyanovsk
E-mail: fedotova.tatyana@list.ru

Для цитирования:

Федотова Т.А., Богданов И.И., Васильев Д.А., Пульчеровская Л.П. Изучение чувствительности бактерий вида *Pseudomonas stutzeri* и их ассоциатов к различным красителям. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(2):56–60.

For citation:

Fedotova T.A., Bogdanov I.I., Vasilyev D.A., Pulcherovskaya L.P. Study of the sensitivity of bacteria of the species *Pseudomonas stutzeri* and their associates to various dyes. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(2):56–60 (in Russian).

ПОТЕНЦИАЛ РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АССОЦИИИ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* K802 И *PARACOCCLUS YEEI* ВКМ-3302 ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ БПК₅

А.С. ХАРЬКОВА*, В.А. АРЛЯПОВ, С.К. КУРБАНАЛИЕВА, Р.В. ЛЕПИКАШ

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула

Исследовали возможность формирования рецепторного элемента на основе ассоциации бактерий *Escherichia coli* K802 (*E. coli*) и *Paracoccus yevei* ВКМ-3302 (*P. yevei*) для экспресс-детекции индекса БПК₅ в условиях медиаторного биоэлектрокатализа. При регистрации сорбита, ЭДТА, метановой кислоты выявлены конкурирующие взаимодействия бактерий в составе ассоциации: каждый индивидуальный микроорганизм окисляет указанные субстраты, а сформированная ассоциация к ним нечувствительна. В ходе эксплуатации рабочего электрода оба штамма проявляют окислительную активность в течение 24 суток, причем преобладающая роль микроорганизмов в формировании аналитического сигнала меняется: сначала преобладают *E. coli* за счет более быстрой адаптации, а затем *P. yevei* — за счет большей долговременной стабильности. В целом, рецепторный элемент на основе ассоциации окисляет достаточно большое количество субстратов (16 соединений), линейный диапазон определяемых значений БПК₅ составляет 60–200 мг/дм³, уступая по чувствительности литературным аналогам, разработанную аналитическую систему можно использовать при анализе загрязненных проб, например, сточных вод до очистки.

Ключевые слова: биосенсор, биохимическое потребление кислорода, БПК₅, медиатор ферроцен, ассоциация микроорганизмов.

Введение

Индекс биохимического потребления кислорода (БПК) является одним из часто используемых показателей для оценки степени загрязнения сточных вод органическими веществами. По определению БПК — это количество кислорода, потребляемого микроорганизмами в процессе биодеградации органических веществ, находящихся в 1 дм³ пробы [5]. Стандартный метод определения БПК основан на инкубации пробы в течение 5 (БПК₅) или 20 (БПК₂₀) суток при 20±1 °С и измерении разности содержания растворенного кислорода до и после инкубации. Таким образом, проведение стандартного анализа требует минимум 5 суток, что не дает возможность оперативно оценить степень загрязненности сточных вод. Использование биосенсоров позволяет сократить время анализа до нескольких минут благодаря использованию кинетического подхода, подразумевающего измерение начальной скорости окисления модельных растворов

с известным значением БПК₅ (например, глюкозы и глутаминовой кислоты) [3, 6, 7, 10, 11, 14, 19, 21, 22].

Исходя из инокулята, используемого в стандартном методе анализа, — активный ил, речная вода, аквариумная вода [5], для формирования биорецепторов используют различные ассоциации микроорганизмов, что расширяет круг окисляемых субстратов, улучшает корреляцию со стандартным методом, увеличивает чувствительность биорецепторного элемента [2, 9, 15–17]. В работе [18] сравнивали возможности определения БПК₅ с помощью смешанного консорциума, который культивировали из сточной воды (микробный состав не описан, но указано, что 5,65% консорциума составляет бактерии *Shewanella loihica* PV-4), и индивидуальной культуры *Shewanella loihica* PV-4. Диапазон определяемых концентраций БПК₅ для биорецептора на основе консорциума составил 0 — 65,25 мг О₂/дм³, а на основе индивидуальной культуры — 0–43,50 мг О₂/дм³. Более высокую чувствительность консорциума авторы связали с более высокой биологической активностью и скоростью окисления субстрата. Кроме того, доля живых метаболически активных микроорганизмов составила 88,0±2,4% в смешанном консорциуме, в отличие от рецепторного элемента на основе индивидуальных культур, где количество метаболически активных клеток составляет лишь 75,2±4,9%.

© 2022 г. Харькова А.С., Арляпов В.А., Курбанадиева С.К., Лепикаш Р.В.

* **Автор для переписки:**

Харькова Анна Сергеевна

к.х.н., доцент кафедры «Химия», Тульский государственный университет

E-mail: anyuta_zaytseva@mail.ru

Возможной проблемой использования сложного микробного консорциума в долгосрочной перспективе может стать количественное изменение микробного состава, что приведет к изменению основных аналитических характеристик биосенсора (чувствительность, воспроизводимость и сходимость результатов анализа). Кроме того, возможные контаминации в рецепторном элементе могут возникать после контакта с анализируемой пробой природной и сточной воды. Если последняя проблема решается на стадии пробоподготовки, то обеспечить постоянство микробного состава при длительной эксплуатации рецепторной системы можно за счет снижения конкуренции микроорганизмов за анализируемый субстрат, например, с помощью послойной иммобилизации выделенных из активного ила бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, *Pseudomonas veronii* DSM 11331^T и *Bacillus proteolyticus* TD42^T [8]. Анализ природных вод (8 образцов) с помощью разработанной рецепторной системы показал хорошую корреляцию с результатами стандартного метода — коэффициент корреляции составил 0,9956. Второй подход, позволяющий добиться стабильности микробного состава — использование микроорганизмов, у которых сходны фазы роста. В работе [20] было показано, что использование штаммов с разными ростовыми параметрами, например, дрожжей *Ogataea angusta* ВКМ Y-2518, *Blastobotrys adenivorans* ВКМ Y-2677 и *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, приводит к доминированию дрожжей *D. hansenii* в составе рецепторного элемента на основе ассоциации, что объяснялось более высокой скоростью роста и активными метаболическими процессами дрожжей *D. hansenii*: удельная скорость роста культуры *D. hansenii* составляет 0,259 ч⁻¹, тогда как для дрожжей *B. adenivorans* и *O. angusta* — 0,158 ч⁻¹ и 0,160 ч⁻¹ соответственно.

Целью настоящей работы являлось исследование возможности совместного использования микроорганизмов *Escherichia coli* К802 и *Paracoccus yeei* ВКМ-3302 в составе рецепторного элемента в сочетании с амперометрическим графито-пастовым электродом и медиатором ферроценом для экспресс-оценки индекса БПК₅.

Материалы и методы

Реактивы и материалы. Триптон («Panreac», Испания), дрожжевой экстракт («Helicon», Россия), хлорид натрия («Диаэм», Россия) использовали для выращивания микроорганизмов. Для создания рабочего графито-пастового электрода применяли графитовую

пудру с размером частиц 75 мкм с высокой чистотой 99,997% («Fluka», Германия), парафиновое масло («Fluka», Германия) и диализную мембрану с пределом пропускания 14 кДа («Roth», Германия). В качестве медиатора электронного транспорта использовали ферроцен («Aldrich», Германия). Калий-натрий фосфатный буферный раствор с pH=6,8 и 7,5 (33 мМ КН₂РO₄ + 33 мМ Na₂НРO₄, «Диаэм», Россия) использовали для работы с микроорганизмами. Глюкозу («Диаэм», Россия) и глутаминовую кислоту («Диаэм», Россия) использовали для приготовления модельного раствора с БПК₅ 205 мг O₂/дм³.

Микроорганизмы. Бактерии *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 (*P. yeei*) предоставлены Всероссийской коллекцией микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук — обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН (г. Пущино). Бактерии *Escherichia coli* К-802 (*E. coli*) предоставлены лабораторией биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН — обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Культивирование микроорганизмов. Бактерии выращивали в среде Луриа — Бертани: триптон — 1%, NaCl — 1%, дрожжевой экстракт — 0,5%. Среду для выращивания клеток стерилизовали автоклавированием при давлении в 1,1 атм и температуре 121 °С в течение 45 минут. Клетки выращивали аэробно в течение 24 часов в качалочных колбах объемом 750 см³ при температуре 28 °С в шейкер-инкубаторе ES-20/60 («BioSan», Латвия). Затем полученную биомассу центрифугировали на центрифуге «TG16WS» («Поликом LTD», Россия) при комнатной температуре 15 минут (9000 g). Далее центрифугат дважды промывали калий-натрий-фосфатным буферным раствором с pH 6,8 при культивировании *P. yeei* и pH 7,5 при культивировании *E. coli*. Осевшие клетки переносили в свежие порции буферного раствора, распределяли по порциям и осаждали на центрифуге «MiniSpin plus» («Eppendorf», Россия). Промытую биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при температуре минус 25 °С.

Формирование рабочего электрода

Рабочий электрод формировали следующим образом: пластиковую трубку с площадью рабочей поверхности 6,3 мм² заполняли приготовленной пастой «графитовая пудра-минеральное масло» следующего состава: 90 мг графитовой пудры смешивали с 500 мкл раствора ферроцена в ацетоне, 0,02 мг/мкл. После испарения ацетона добавляли 40 мкл парафинового масла и

замешивали пасту. Такой модифицированной пастой заполняли пластиковую трубку измерительного электрода.

Для иммобилизации бактерий на рабочем электроде готовили суспензию бактерий *P. yeai* и *E. coli* с суммарным содержанием 330 мг сырого веса/мл соотношение клеток 1:1. Полученную ассоциацию иммобилизовали следующим образом: на рабочую поверхность электрода наносили 10 мкл суспензии и подсушивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Для удерживания клеток на поверхности электрода применяли закрепляющую диализную мембрану, которую фиксировали при помощи пластикового кольца.

Биосенсорные измерения

Измерения выполняли с использованием гальванопотенциостата «РС-микро» («НТФ Вольта», Россия). Для регистрации ответов биосенсора применяли двухэлектродную схему. Рабочим электродом служил графитопастовый с иммобилизованными клетками бактерий, электродом сравнения — насыщенный хлорсеребряный. Электроды во время измерения погружали в ячейку с раствором рН=6,8. Все измерения проводили при постоянном потенциале 250 мВ. Температура измерения составляла 20 °С, объем ячейки — 5 мл. После установления стабильного уровня тока в ячейку микропипеткой вводили необходимое для получения заданной концентрации количество раствора анализируемого вещества. После каждого измерения проводили промывку ячейки буферным раствором.

Результаты и обсуждение

Субстратная специфичность биорецепторного элемента на основе ассоциации бактерий.

С целью расширения спектра окисляемых субстратов и повышения правильности определения биохимического потребления кислорода для создания БПК-биосенсоров сформировали биорецепторный элемент на основе медиатора ферроцена и ассоциации бактерий *P. yeai* и *E. coli*. В качестве модельного медиатора электронного транспорта был использован ферроцен, так как электрохимическая реакция с его участием не зависит от рН среды, а малая растворимость в воде ферроцена позволяет модифицировать графитовую пасту, иммобилизуя медиатор на поверхности рабочего электрода [21]. Все индивидуальные микроорганизмы и ассоциация бактерий способны взаимодействовать с искусственным акцептором электронов — ферроценом, что подтверждалось фактом наличия ответов биосенсора при рабочем потенциале 250 мВ, наиболее часто используемым при работе с модифицированными графитопастовыми электродами с иммобилизованными клетками микроорганизмов [3, 21]. Бактерии *E. coli* присутствуют в природных и сточных водах, что повышает чувствительность определения БПК₅ [11]. Бактерии *P. yeai*, выделенные из активного ила, продемонстрировали высокую чувствительность определения БПК₅ в условиях медиаторного биоэлектрокатализа [6]. Для формирования стабильных и воспроизводимых ассоциаций необходимо обеспечить отсутствие конкурирующих взаимодействий между микроорганизмами, что достигается путем использования в ее составе микроорганизмов с разным набором ферментных систем [20]. Наличие конкурирующих взаимодействий выявляли по изменению субстратной специфичности рецепторного элемента на основе сформированной ассоциации бактерий и индивидуальных микроорганизмов [6, 11], составляющих ассоциацию (рис. 1).

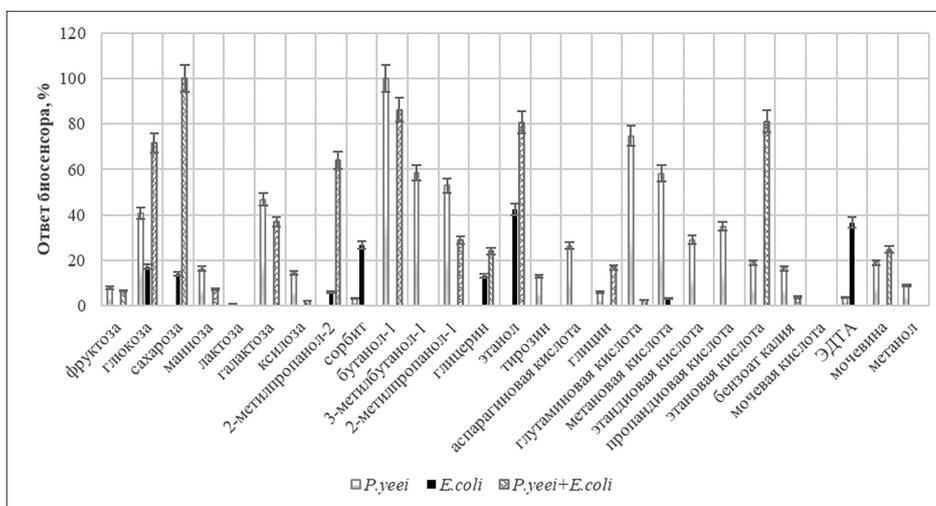


Рис. 1. Субстратная специфичность биорецепторов на основе бактериальной ассоциации и индивидуальных микроорганизмов *P. yeai* [6] и *E. coli* [11], из которых составлена ассоциация

Исходя из рисунка 1, при использовании медиатора ферроцена и ассоциации бактерий *P. yevei* и *E. coli* можно зарегистрировать окисление 16 субстратов, что больше, чем с помощью биосенсора на основе бактерий *E. coli* (7 субстратов) [11], но меньше, чем с помощью аналогичной системы на основе бактерий *P. yevei* [6] (22 субстрата). В работе [20] показано, что деградиционная активность ассоциации не всегда равна сумме активностей отдельных микроорганизмов. В ряде случаев активность консорциума может быть ниже, чем у составляющих ее монокультур, что также наблюдается в данной работе. Такой эффект может объясняться возникновением конкуренции между *P. yevei* и *E. coli* за субстрат: зарегистрировать окисление сорбита, ЭДТА, метановой кислоты с помощью ассоциации не удастся, тогда как с помощью отдельных штаммов успешно осуществимо [6, 11].

В целом бактерии *P. yevei* обладают большим набором ферментов — об этом можно судить по субстратной специфичности, однако бактерии *E. coli* окисляют такие субстраты, как сахароза, 2-метилпропанол-2, глицерин, этанол, чего нельзя сказать о *P. yevei*. Анализируя результаты, отраженные на рисунке 1, можно отметить положительную тенденцию окисления указанных субстратов сформированной ассоциацией благодаря введению в ее состав *E. coli*.

Воспроизводимость аналитических сигналов, формируемых биорецепторами на основе ассоциации бактерий.

При разработке биорецепторов наиболее важной метрологической характеристикой является воспроизводимость, которая характеризует степень близости друг к другу единичных определений, полученных в разных условиях, рассеяние единичных результатов относительно среднего. Для оценки такой характеристики было сформировано 5 различных электродов, значения их аналитических сигналов исследовали с помощью раствора глюкозы и глутаминовой кислоты с конечными концентрациями 150 мг/л каждого компонента; значение БПК₅ данного раствора составляет 205 мгО₂/дм³ [5].

Для оценки воспроизводимости серий ответов, полученных разными биорецепторами, была проверена гипотеза о неразличимости дисперсий с помощью статистического критерия F-распределения. Во всех случаях экспериментально найденный F-критерий меньше критического значения 9,3; сформулированная нуль-гипотеза была подтверждена: воспроизводимость ответов, полученных разными электродами одинакова, а их дисперсии попарно однородны. Для оценки значимости различия средних ответов, полученных разными электродами, к каждой выборке попарно был применен модифицирован-

ный тест Стьюдента. Сигналы электродов не превышают критического значения и отличаются незначимо.

Долговременная стабильность и изменение субстратной специфичности ассоциации при эксплуатации рабочего электрода.

Рекомендуемый срок эксплуатации рецепторного элемента на основе ассоциации устанавливали по изменению динамики ответа биосенсора на модельный раствор. Динамика аналитических сигналов биорецептора на основе ассоциации и индивидуальных культур представлена на рисунке 2.

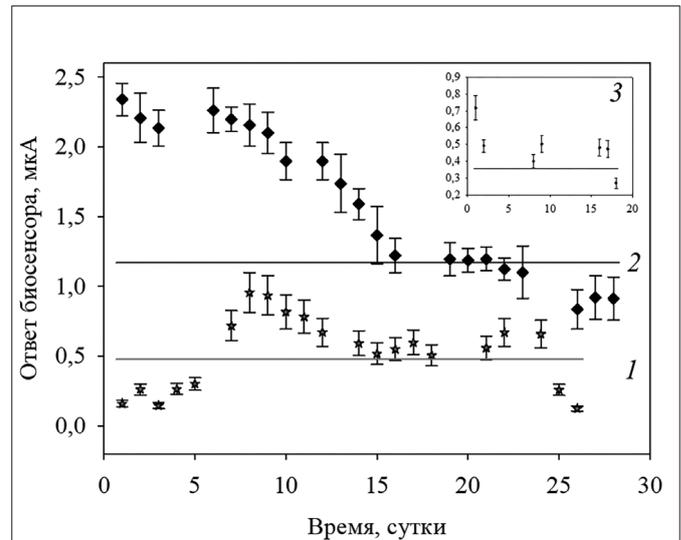


Рис. 2. Долговременная стабильность биорецепторов на основе бактериальной ассоциации (1) и индивидуальных микроорганизмов *P. yevei* (2) и *E. coli* (3), из которых составлена ассоциация

Динамика ответов биорецепторов на основе индивидуальных культур постепенно снижается, к 22-му (микроорганизмы *P. yevei*) или к 18-му дню (микроорганизмы *E. coli*) падает более чем на 50% от первоначального значения. Для биорецептора на основе ассоциации указанных культур характерен период адаптации длительностью 5 суток, после чего наблюдается период максимальной окислительной активности рецепторного элемента, а на 25-е сутки ответ биосенсора снижается более, чем на 50% от максимального значения. Сформированная бактериальная ассоциация не теряет своей окислительной активности внутри консорциума в течение 20 суток, но требует 5-суточной подготовки электрода к эксплуатации, пока клетки в составе ассоциации не адаптируются.

Со временем ответ биосенсора на различные субстраты может меняться в связи с тем, что меняется состав консорциума: один штамм может вытеснить другой или меняется характер окислительной активности штаммов в составе рецепторного элемента. Динамику окислительной

стабильности сформированной ассоциации контролировали с помощью следующих субстратов: галактоза, этанол, сорбит, мочеви́на и ксилоза. Галактозу, ксилозу, мочеви́ну хорошо окисляет штамм *P. yeai*, этанол — *E. coli*, сорбит — оба штамма, но ассоциация нечувствительна к данному веществу (см. рис. 1) [6, 11]. На рисунке 3 показана динамика ответов биорецепторов на указанные субстраты.

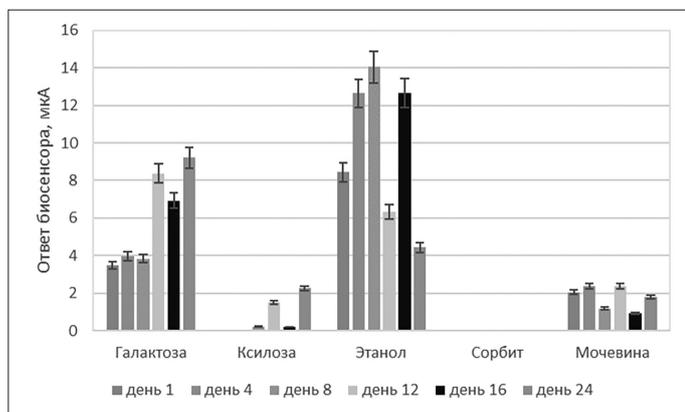


Рис. 3. Изменение субстратной специфичности биорецепторного элемента на основе ассоциации бактерий *P. yeai* и *E. coli* при эксплуатации рабочего электрода

Анализируя динамику ответов биорецептора на основе ассоциации, представленной на рисунке 3, с 1-го по 4-й день наблюдается ответ на 3 субстрата из 5 — этанол, галактозу и мочеви́ну, что, по всей видимости, связано с адаптацией микроорганизмов; причем, скорость окисления субстратов ассоциацией падает в следующем ряду: этанол>галактоза>мочевина. На 8-й день ответ сенсора достигает максимального значения, клетки штаммов прошли период адаптации, при этом появляется небольшой ответ на ксилозу. Соотношение скоростей окисления субстратов сохраняется, как и в первый день наблюдения: этанол>галактоза>мочевина>ксилоза. На 12-й день ответы биосенсора падают, сходная тенденция наблюдается и при окислении раствора глюкозы и глутаминовой кислоты (см. рис. 2). Кроме того, меняется эффективность окисления субстратов ассоциацией: наибольший ответ был зарегистрирован на галактозу, это можно связать или с изменением состава ассоциации, или более длительной адаптацией бактерий *P. yeai*, так как именно они отвечают за окисление галактозы, индивидуальные микроорганизмы клетки *E. coli* на галактозу не отвечают. С 14-го по 24-й день активность рецепторного элемента колеблется в пределах 50–60% от максимального значения (см. рис. 2). На 16-й день (см. рис. 3) соотношение эффективности окисляемых субстратов становится прежним — наибольший ответ зарегистрирован на этанол. Предположительно

это связано со снижением окислительной активности *P. yeai*. На 24-й день скорость окисления субстратов снижается в ряду: галактоза>этанол>мочевина>ксилоза. Вероятно, это связано с потерей окислительной активности бактерии *E. coli* и преобладанием бактерии *P. yeai*.

Таким образом, преобладающая роль бактерий в составе ассоциации меняется: *E. coli* быстрее адаптируются в составе рецептора (наблюдается больший ответ на этанол), но существенно уступают бактериям *P. yeai* по долговременной стабильности. Поэтому после адаптации бактерий *P. yeai* и на последнем этапе функционирования электрода (когда окислительная активность ассоциации приближается к 50% от максимального значения) — наблюдается максимальный ответ на галактозу. На сорбит биосенсор по-прежнему не отвечал, что указывает на конкуренцию двух бактериальных штаммов за указанный субстрат на протяжении всего периода функционирования рабочего электрода: и *P. yeai*, и *E. coli* проявляют окислительную активность в составе ассоциации.

Линейный диапазон определяемых концентраций БПК₅.

Для рецепторного элемента на основе медиатора ферроцена и ассоциации бактерий были получены градуировочные зависимости аналитического сигнала от концентрации БПК₅ (рис. 4).

Зависимость, приведенную на рисунке 4, аппроксимировали уравнением, аналогичным уравнению Хилла [13]:

$$R = \frac{R_{\max} [S]^h}{[S_{0,5}]^h + [S]^h},$$

где R — ответ биосенсора; $[S]$ — концентрация субстрата; R_{\max} — максимальный ответ биосенсора, достигаемый при $[S] \rightarrow \infty$, $[S_{0,5}]$ — концентрация полунасыщения, то есть концентрация субстрата, при которой $R = R_{\max} / 2$; h — коэффициент Хилла.

В результате обработки экспериментальных данных в программе SigmaPlot были получены следующие значения параметров эмпирического уравнения: $R_{\max} = 1,17 \pm 0,03$ мкА; $[S_{0,5}] = 196 \pm 6$ мг O_2 /дм³; $h = 2,4 \pm 0,2$. S-образная форма калибровочной зависимости может быть результатом положительных кооперативных взаимодействий между сайтами связывания субстрата [13].

Для снижения ошибок анализа использовали линейную часть градуировочной зависимости, ограниченную сверху $[S_{0,5}]$. Сравнивая полученные значения $[S_{0,5}]$ для ассоциации и индивидуальных микроорганизмов, на основе которых сформирована данная ассоциация,

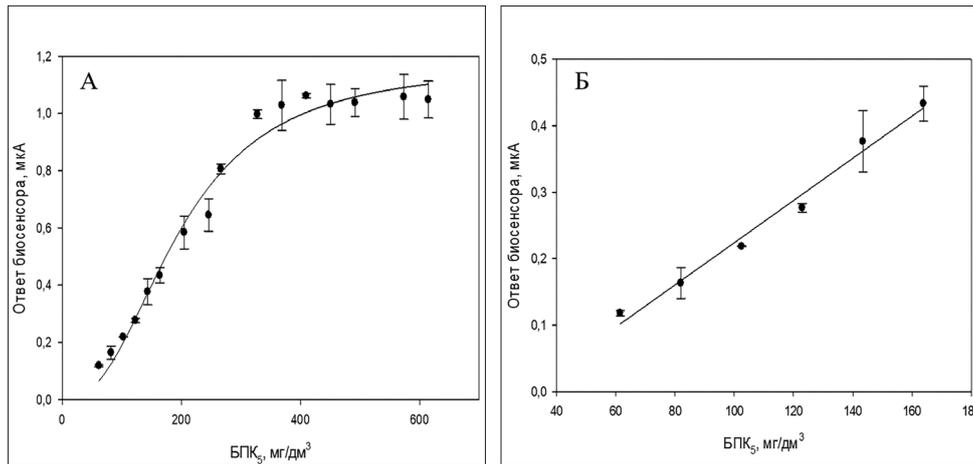


Рис. 4. Зависимость ответа биосенсора на основе бактериальной ассоциации от БПК₅ модельного раствора глюкозы и глутаминовой кислоты (А) и линейный диапазон БПК₅ (Б)

можно заключить, что сродство к модельному субстрату ассоциации близко к биорецептору на основе бактерий *P. yeai* ($[S_{0,5}] = 200 \text{ мг/дм}^3$, [5]), но ниже, чем у биорецептора на основе *E. coli* ($[S_{0,5}] = 1,59 \pm 0,07 \text{ мг/дм}^3$). Близость $[S_{0,5}]$ для биорецептора на основе ассоциации к значению для биорецептора на основе *P. yeai* подтверждает предположение о большем вкладе рассматриваемых микроорганизмов в момент достижения рецептора на основе ассоциации максимальной окислительной активности.

Нижняя граница линейного участка градуировочной зависимости (см. рис. 4) соответствует нижней границе определяемых концентраций БПК₅ — концентрации, которую можно зарегистрировать; при этом величина относительного стандартного отклонения ответа биосенсора не превышает критического 33%. Нижняя

граница определяемых концентраций для биорецептора на основе ассоциации составила 61 мг/дм^3 , что существенно уступает нижним границам рецепторных элементов на основе индивидуальных микроорганизмов ($1,3$ и $0,7 \text{ мг/дм}^3$ для бактерий *P. yeai* и *E. coli*, соответственно). По всей видимости, это связано с наличием положительных кооперативных взаимодействий ($h \neq 1$) в биорецепторе на основе ассоциации [13]. Таким образом, линейный диапазон БПК₅ биорецептора на основе ассоциации составляет $61\text{--}164 \text{ мг О}_2/\text{дм}^3$, что значительно уже, чем для биорецепторов на основе бактерий *P. yeai* — $1,3\text{--}200 \text{ мг О}_2/\text{дм}^3$ [6], но шире, чем для биорецептора на основе *E. coli* — $0,7\text{--}1,59 \text{ мг/дм}^3$.

Полученные характеристики биоэлектрода на основе ассоциации сравнивали с другими работами (табл. 1).

Таблица 1

Разработанный биосенсор на основе бактериальной ассоциации и литературные аналоги

Микроорганизмы/акцептор электронов	Диапазон определяемых концентраций, мгО ₂ /дм ³	Долговременная стабильность, сутки	Операционная стабильность, %	Ссылка
<i>P. yeai</i> , <i>E. coli</i> /ферроцен	61–164	24	6	Данная работа
<i>E. coli</i> /ферроцен	0,7–1,59	17	2	Данная работа
<i>P. yeai</i> /ферроцен	1,3–200	22	2,9	[6]
Активный ил/ гексацианоферрат (III) калия	0,01–0,23	53	3,8	[2]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / гексацианоферрат (III) калия, менадион	10–220	_*	4,16	[22]
<i>Chromobacterium violaceum</i> / гексацианоферрат (III) калия	20–225	-	15,5%	[12]
<i>D. hansenii</i> / ферроцен	25–320	38	2,2	[3]

Примечание: * — не определено

Следует отметить, что разработанный биосенсор уступает по нижней границе БПК₅ представленным литературным аналогам. Однако биорецепторный элемент может быть использован для оценки БПК₅ городских хозяйственно-бытовых сточных вод, значения БПК₅ может достигать до 720 мг О₂/дм³ [1]. Кроме того, биосенсор может быть использован для определения БПК₅ сточных вод с пищевых производств, где данный показатель в зависимости от типа пищевого производства находится в диапазоне от 600–1100 мг О₂/дм³ для мясоперерабатывающих предприятий и до 10000–15000 мг О₂/дм³ — для стоков с пивоваренных производств [4].

Заключение

В настоящей работе было проведено исследование формирования рецепторной системы на основе бактериальной ассоциации для экспресс-оценки БПК₅, исследование динамики аналитического сигнала в ходе эксплуатации рецепторной системы дополняет известные знания и возможности применения ассоциаций и сложных консорциумов в медиаторном биоэлектрокатализе. На данный момент существуют ограничения по практическому использованию разработанной рецепторной системы: исходя из низкой чувствительности, предложенная система подходит только для экспресс-оценки загрязнения неочищенных сточных вод. Предложенные подходы к выявлению конкурирующих взаимодействий внутри рецепторного элемента на основе ассоциаций открывают возможности получать биорецепторы с контролируемым микробным составом и чувствительностью, близкой к биорецепторам на основе активного ила. Однако, в отличие от последних, биорецепторы с заданным микробным составом проще стандартизировать.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, номер гранта МК-4815.2022.1.4.

Литература

1. Голод Ю.В., Дубенок С.А. Условия формирования хозяйственно-бытовых сточных вод, поступающих в централизованные сети канализации населенных пунктов Республики Беларусь / Сахаровские чтения 2020 года: экологические проблемы XXI века, 2020. — С. 356–359.

2. Зайцева А.С. (Харькова А.С.), Арляпов В.А., Решетиллов А.Н. Медиаторный биосенсор на основе микроорганизмов активного ила для экспресс-определения низких значений БПК₅ // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2017. — Т. 13. — № 1. — С. 50–57.
3. Зайцева А.С., Арляпов В.А., Юдина Н.Ю., Носова Н.М., Алферов В.А., Решетиллов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе ферроцена и дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — Т. 53. — № 3. — С. 381–387.
4. Кулаков А.Ю., Головатый С.Е. Разработка критериев оценки и требований к локальной очистке производственных сточных вод пищевой промышленности Республики Беларусь / Сахаровские чтения 2019 года: экологические проблемы XXI века. — 2019. — С. 57–60.
5. ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации (БПКполн) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. — М., 1997. — 25 с.
6. Харькова А.С., Арляпов В.А., Туровкая А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетиллов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила // Прикладная биохимия и микробиология. — 2019. — Т. 55. — № 2. — С. 199–209.
7. Arlyapov V.A., Kharkova A.S., Kurbanaliyeva S.K., Kuznetsova L.S., Machulin A.V., Tarasov S.E., Melnikov P.V., Ponamareva O.N., Alferov V.A., Reshetilov A.N. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor // Enzyme and Microbial Technology. — 2021. — Vol. 143. — Art. 109706. doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109706.
8. Arlyapov V.A. et al. A biosensor based microorganisms immobilized in layer-by-layer films for the determination of biochemical oxygen demand // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2021. — Vol. 57. — No. 1. — P. 133–141.
9. Hsieh M.C., Chung Y.C. Measurement of biochemical oxygen demand from different wastewater samples using a mediator-less microbial fuel cell biosensor // Environmental technology. — 2014. — Vol. 35. — No. 17. — P. 2204–2211.
10. Hu J., Li Y., Gao G., Xia S. A mediated BOD biosensor based on immobilized *B. subtilis* on three-dimensional porous graphene-polyppyrrrole composite // Sensors. — 2017. — Vol. 17. — No. 11. — Art. 2594. doi: 10.3390/s17112594.
11. Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Ilyukhina A.S., Ponamareva O.N., Alferov V.A., Reshetilov A.N. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen

- demand assay // 3 Biotech. – 2021. – Vol. 11. – No. 5. – Art. 222. doi: 10.1007/s13205-021-02709-8.
12. Khor B.H. et al. A redox mediated UME biosensor using immobilized *Chromobacterium violaceum* strain R1 for rapid biochemical oxygen demand measurement // *Electrochimica Acta*. – 2015. – Vol. 176. – P. 777–783.
 13. Kurganov B.I. et al. Criterion for Hill equation validity for description of biosensor calibration curves // *Analytica Chimica Acta*. – 2001. – Vol. 427. – No. 1. – P. 11–19.
 14. Liu Y. et al. A current sensing biosensor for BOD rapid measurement // *Archaea*. – 2020. – Vol. 2020. – Art. 8894925. doi: 10.1155/2020/8894925.
 15. Lv H. et al. Determination of seawater biochemical oxygen demand based on in situ cultured biofilm reactor // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 903. – P. 115872.
 16. Niyomdech S., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Thavarungkul P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2017. – Vol. 241. – P. 473–481.
 17. Pham T.T.P. et al. Self-build packed-bed bioreactor for rapid and effective BOD estimation // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – Vol. 26. – No. 25. – P. 25656–25667.
 18. Yi Y. et al. Comparative analysis of microbial fuel cell based biosensors developed with a mixed culture and *Shewanella loihica* PV-4 and underlying biological mechanism // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 265. – P. 415–421.
 19. Yi Y. et al. Dual detection of biochemical oxygen demand and nitrate in water based on bidirectional *Shewanella loihica* electron transfer // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 309. – P. 123402.
 20. Yudina N.Y. et al. A yeast co-culture-based biosensor for determination of waste water contamination levels // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2015. – Vol. 78. – P. 46–53.
 21. Zaitseva A.S. (Khar'kova A.S.), Arlyapov V.A., Yudina N.Yu., Alferov S.V., Reshetilov A.N. Use of one- and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2017. – Vol. 98. – P. 43–51.
 22. Zhao C. et al. Bacterial cellulose immobilized *S. cerevisiae* as microbial sensor for rapid BOD detection // *Fibers and Polymers*. – 2021. – Vol. 22. – No. 5. – P. 1208–1217.
 2. Zaytseva AS (Khar'kova AS), Arlyapov VA, Reshetilov AN. Mediatorny biosensor na osnove mikroorganizmov aktivnogo ila dlya ekspress-opredeleniya nizkikh znacheniy BPK₅. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2017; 13(1):50–57 (in Russian).
 3. Zaytseva AS, Arlyapov VA, Yudina NYU, Nosova NM, Alferov VA, Reshetilov AN. Mediatorny BPK-biosensor na osnove ferrotsena i drozhzhevykh kletok *Debaryomyces hansenii*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2017; 53(3):381–387 (in Russian).
 4. Kulakov AYu, Golovatyy SYe. Razrabotka kriteriyev otsenki i trebovaniy k lokal'noy ochistke proizvodstvennykh stochnykh vod pishchevoy promyshlennosti Pеспублики Belarus'. *Sakharovskiye chteniya 2019 goda: ekologicheskiye problemy XXI veka* 2019: 57–60 (in Russian).
 5. ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97. Kolichestvennyy khimicheskyy analiz vod. Metodika vypolneniya izmereniy biokhimicheskoy potrebnosti v kislorode posle n-dney inkubatsii (BPK_{полн}) v poverkhnostnykh presnykh, podzemnykh (gruntovykh), pit'yevykh, stochnykh i ochishchennykh stochnykh vodakh. Moscow, 1997: 25 (in Russian).
 6. Khar'kova AS, Arlyapov VA, Turovkaya AD, Avtukh AN, Starodumova IP, Reshetilov AN. Mediatorny BPK-biosensor na osnove kletok mikroorganizmov, vydelennykh iz aktivnogo ila. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2019; 55(2):199–209 (in Russian).
 7. Arlyapov VA, Kharkova AS, Kurbanaliyeva SK, Kuznetsova LS, Machulin AV, Tarasov SE, Melnikov PV, Ponamoreva ON, Alferov VA, Reshetilov AN. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor. *Enzyme and Microbial Technology* 2021; 143:109706. doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109706.
 8. Arlyapov VA et al. A biosensor based microorganisms immobilized in layer-by-layer films for the determination of biochemical oxygen demand. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2021; 57(1):133–141.
 9. Hsieh MC, Chung YC. Measurement of biochemical oxygen demand from different wastewater samples using a mediatorless microbial fuel cell biosensor. *Environmental technology* 2014; 35(17):2204–2211.
 10. Hu J, Li Y, Gao G, Xia S. A mediated BOD biosensor based on immobilized *B. subtilis* on three-dimensional porous graphene-poly pyrrole composite. *Sensors* 2017; 17(11):2594. doi: 10.3390/s17112594.
 11. Kharkova AS, Arlyapov VA, Ilyukhina AS, Ponamoreva ON, Alferov VA, Reshetilov AN. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen demand assay. *3 Biotech* 2021; 11(5):222. doi: 10.1007/s13205-021-02709-8.
 12. Khor BH et al. A redox mediated UME biosensor using immobilized *Chromobacterium violaceum* strain R1 for rapid

References

1. Golod YuV, Dubenok SA. Usloviya formirovaniya khozyaystvenno-bytovykh stochnykh vod, postupayushchikh v tsentralizovannyye seti kanalizatsii naselennykh punktov Pспублики Belarus'. *Sakharovskiye chteniya 2020 goda: ekologicheskiye problemy XXI veka*, 2020: 356–359 (in Russian).

- biochemical oxygen demand measurement. *Electrochimica Acta* 2015; 176:777–783.
13. Kurganov BI et al. Criterion for Hill equation validity for description of biosensor calibration curves. *Analytica Chimica Acta* 2001; 427(1):11–19.
 14. Liu Y et al. A current sensing biosensor for BOD rapid measurement. *Archaea* 2020; 2020:8894925. doi: 10.1155/2020/8894925.
 15. Lv H et al. Determination of seawater biochemical oxygen demand based on in situ cultured biofilm reactor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2021; 903:115872.
 16. Niyomdecha S, Limbut W, Numnuam A, Asawatreratanakul P, Kanatharana P, Thavarungkul P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2017; 241:473–481.
 17. Pham TTP et al. Self-build packed-bed bioreactor for rapid and effective BOD estimation. *Environmental Science and Pollution Research* 2019; 26(25):25656–25667.
 18. Yi Y et al. Comparative analysis of microbial fuel cell based biosensors developed with a mixed culture and *Shewanella loihica* PV-4 and underlying biological mechanism. *Biore-source Technology* 2018; 265:415–421.
 19. Yi Y et al. Dual detection of biochemical oxygen demand and nitrate in water based on bidirectional *Shewanella loihica* electron transfer. *Bioresource Technology* 2020; 309:123402.
 20. Yudina NY et al. A yeast co-culture-based biosensor for determination of waste water contamination levels. *Enzyme and Microbial Technology* 2015; 78:46–53.
 21. Zaitseva AS (Khar'kova AS), Arlyapov VA, Yudina NYu, Alferov SV, Reshetilov AN. Use of one- and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology* 2017; 98:43–51.
 22. Zhao C et al. Bacterial cellulose immobilized *S. cerevisiae* as microbial sensor for rapid BOD detection. *Fibers and Polymers* 2021; 22(5):1208–1217.

POTENTIAL OF THE RECEPTOR SYSTEM BASED ON THE ASSOCIATION OF BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* K802 AND *PARACOCCLUS YEEI* VKM-3302 FOR RAPID ASSESSMENT OF BOD₅

A.S. KHARKOVA, V.A. ARLYAPOV, S.K. KURBANALIYEVA, R.V. LEPIKASH

Tula State University», Tula

The possibility of forming a receptor element based on the association of bacteria *Escherichia coli* K802 (*E. coli*) and *Paracoccus yeii* VKM-3302 (*P. yeii*) for rapid detection of the BOD₅ index under conditions of mediator bioelectrocatalysis was investigated. When registering sorbitol, EDTA, and methanoic acid, competing interactions of bacteria in the association were revealed: each individual microorganism oxidizes these substrates, and the formed association is insensitive to them. During the operation of the working electrode, both strains exhibit oxidative activity for 24 days, and the predominant role of microorganisms in the formation of the analytical signal changes: first, *E. coli* prevails due to faster adaptation, and then *P. yeii* – due to greater long-term stability. In general, the receptor element on the basis of association oxidizes a sufficiently large number of substrates (16 compounds), the linear range of the determined values of BOD₅ is 60–200 mg/dm³, inferior in sensitivity to literary analogues, the developed analytical system can be used in the analysis of contaminated samples, for example, wastewater before treatment.

Keywords: biosensor, biochemical oxygen demand, BOD₅, mediator ferrocene, association of microorganisms.

Address:

Kharkova A.S., Ph.D.
Associate Professor of the Department of Chemistry,
Tula State University
E-mail: anyuta_zaytseva@mail.ru

Для цитирования:

Харькова А.С., Арляпов В.А., Курбаналиева С.К., Лепикаш Р.В. Потенциал рецепторной системы на основе ассоциации бактерий *Escherichia coli* K802 и *Paracoccus yeii* VKM-3302 для экспресс-оценки БПК₅. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(2):61–70.

For citation:

Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Kurbanaliyeva S.K., Lepikash R.V. Potential of the receptor system based on the association of bacteria *Escherichia coli* K802 and *Paracoccus yeei* VKM-3302 for rapid assessment of BOD₅. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(2):61–70 (in Russian).

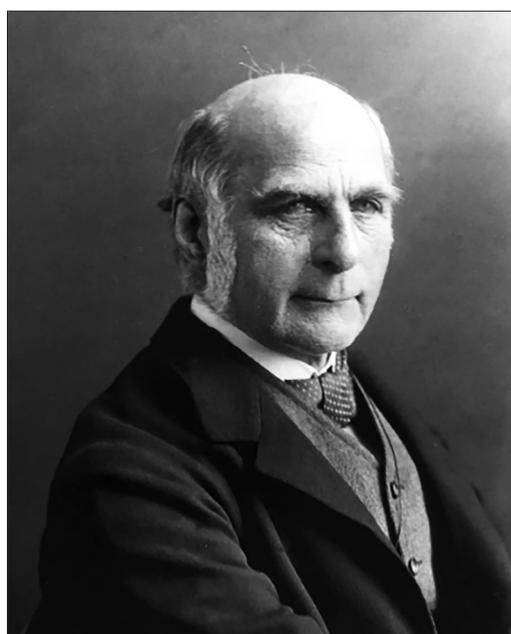
К 200-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ФРЭНСИСА ГАЛЬТОНА, ВЫДАЮЩЕГОСЯ АНГЛИЙСКОГО УЧЕНОГО-ЭНЦИКЛОПЕДИСТА, ОСНОВАТЕЛЯ ЕВГЕНИКИ

В.С. ВОРОБЬЕВ*

Психологический институт РАО, Москва

В связи с 200-летием со дня рождения выдающегося английского ученого Фрэнсиса Гальтона помещаются материалы, освещающие основные аспекты его творчества. Акцент сделан на менее известные в отечественной литературе биографические данные.

Ключевые слова: юбилейные материалы, 200-летие со дня рождения, Фрэнсис Гальтон.



Автор посвящал статью Фрэнсису Гальтону в журнале «Теоретическая и экспериментальная психология» [2], однако 200-летний юбилей позволяет вновь обратиться к имени этого выдающегося человека. Необходимо отметить, что прежняя наша статья была приурочена к 100-летию со дня смерти ученого и поэтому в ней обстоятельно изложены биографические данные и проанализированы основные труды. Было подчеркнута разнообразие его интересов. В связи с этим, во избежание ненужных повторов акценты в настоящей публикации

будут несколько иные (главным образом на иллюстративный и первичный материал): особенно это касается ухода от биографических подробностей.

Некоторые биографические данные и вклад в науку. Фрэнсис Гальтон родился в 1822 году в обеспеченной семье, имевшей в своем составе много одаренных людей. Достаточно упомянуть о том, что он приходился двоюродным братом Чарльзу Дарвину, с которым близко общался всю жизнь и делился своими мыслями и достижениями. Поэтому вполне естественно его последующее обращение к проблеме наследования таланта. Немаловажно и то, что он сам был примером обладателя заметной, даже экстраординарной одаренности. Так что он фактически был «приговорен» к погружению в означенную проблему (ведь он мог пользоваться и материалами самоанализа). По сути и внимание к психологическим проблемам также входит в это общее русло изучения интеллекта человека.

В молодости, наряду с получением образования, он увлекался странствиями: сначала по Европе, а затем совершил довольно рискованное путешествие по тропической Африке, о чем написал книгу, вызвавшую значительный интерес у современников [18]. Больше того, будучи богатым наследником, он позволил себе несколько лет (в 1846—1849 гг.) заниматься только охотой и состязаниями в стрельбе и даже полетал на воздушном шаре (рис. 1).

В 1853 году произошло существенное событие в его жизни, умерившее его страсть к приключениям и познанию географии. Гальтон женился на Луизе Джейн Батлер, дочери директора школы Хэрроу (рис. 2).

С этого времени он изменил свой образ жизни, обосновался в Лондоне и больше не отправлялся в путешествия (кроме туризма на отдыхе совместно с женой).

© Воробьев В.С., 2022

* **Автор для переписки:**

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., научный сотрудник ПИ РАО

E-mail: vorob_vs@mail.ru

Вместе с женой они прожили более 40 лет, вплоть до ее смерти (детей у них не было).

Начиная с данного периода, только наука занимала его ум. Достоинно удивления и восхищения то,

как он решал разнообразные проблемы, возникавшие на его пути, причем диапазон их был довольно большой: от географии и метеорологии до генетики и евгеники.

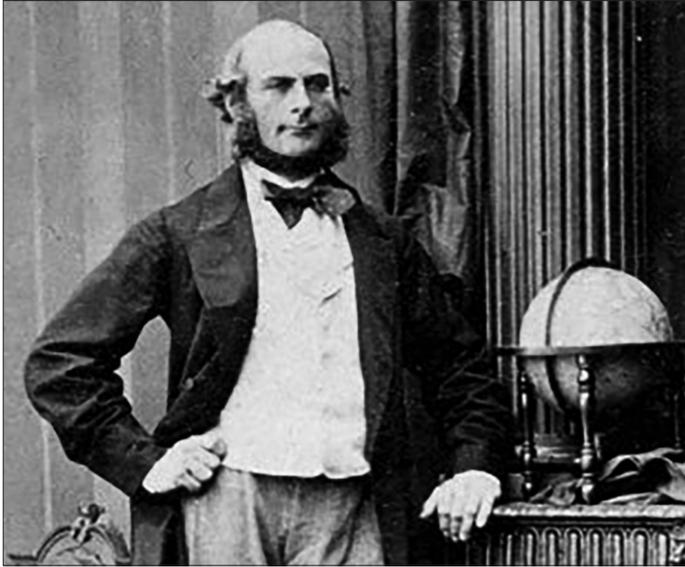


Рис. 1. Фрэнсис Гальтон в зрелые годы



Рис. 2. Жена Гальтона — Луиза Дж. Батлер

В 1850-е — 1860-е годы им выполнен метеорологический цикл работ (вместе с географическими). Всем хорошо известно его разъяснение сущности антициклонов. В это же время Гальтон занялся изучением индивидуальных особенностей людей. Материалом для него послужили обширные этнографические наблюдения, сделанные во время африканских экспедиций.

Дальше возник вопрос о наследовании признаков, в том числе таланта и одаренности. В 1870-е годы его интересы сместились в сферу психологии.

Следует также указать на то, что одним из следствий биометрических исследований Гальтона представляется научное обоснование дактилоскопии.

Наконец, в 1880-е годы Гальтон обратился к вопросам антропологии и проблеме улучшения человеческого рода.

Важным событием в его жизни стал выход в свет в 1883 г. работы «Исследование человеческих способностей и их развитие» [16], в которой впервые был упомянут термин «евгеника». В последующие годы евгеника целиком захватила его.

Надо особо отметить две ключевые публикации. В 1865 году была напечатана статья «Наследственный талант и характер» [15], а в 1869 году — знаменитая книга Гальтона «Наследственный гений» [14]. Эту книгу прочел Чарльз Дарвин и сразу под впечатлением от ее прочтения написал своему кузену восторженное письмо.

Потом она стала для многих специалистов настольной книгой. В русском переводе она вышла в XIX веке и переиздана в наше время под названием «Наследственность таланта: Законы и последствия» [3] (рис.3).

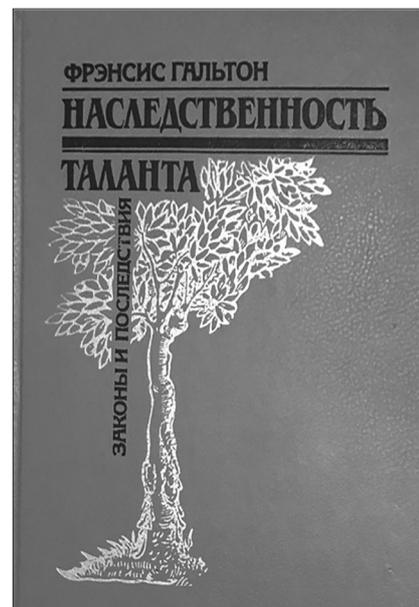


Рис. 3. Переводное издание 1996 г.

Есть еще большая заслуга Гальтона перед мировой наукой. Это — применение статистических методов к изучению распределения способностей. Он обнаружил, что количественные характеристики наследственных

признаков регрессируют к среднему значению. Таким образом, был установлен статистический принцип корреляции между измеряемыми величинами (это он установил в 1888 году).

Гальтон привлек к данному направлению своего ученика Карла Пирсона (рис. 4), а тот, развивая идеи руководителя, вывел формулу коэффициента корреляции. Сейчас положения о регрессии и корреляции являются базовыми в статистике.



Рис. 4. Фрэнсис Гальтон и Карл Пирсон

Ученый не замыкался в кругу сугубо личных интересов. Он участвовал в деятельности Британской ассоциации продвижения науки. Кроме того, он входил в состав совета Королевского географического общества. Ясно, что в отношении исследователя такого ранга были оказаны формальные почести (медали, членство в различных научных обществах, посвящение в рыцари и др.).

Ф. Гальтон умер в 1911 году, прожив почти 90 лет (он страдал туберкулезом). Незадолго до своей кончины он написал автобиографию, которая помогает глубже понять его формирование как выдающегося энциклопедиста XIX столетия [17] (рис. 5). Необходимо заметить, что его автобиография представляет собой редкостный документ, о чем свидетельствуют ясный язык и прекрасное владение предметом изложения. В книге 21 глава, из них: «Изучение медицины» (гл. III); «Юго-Западная Африка» (гл. IX); «Обсерватория Кью и метеорология» (гл. XVI); «Наследственность» (гл. XX); «Улучшение

расы» (гл. XXI) и др. Большой труд о творчестве учителя подготовил его ученик Карл Пирсон [21].

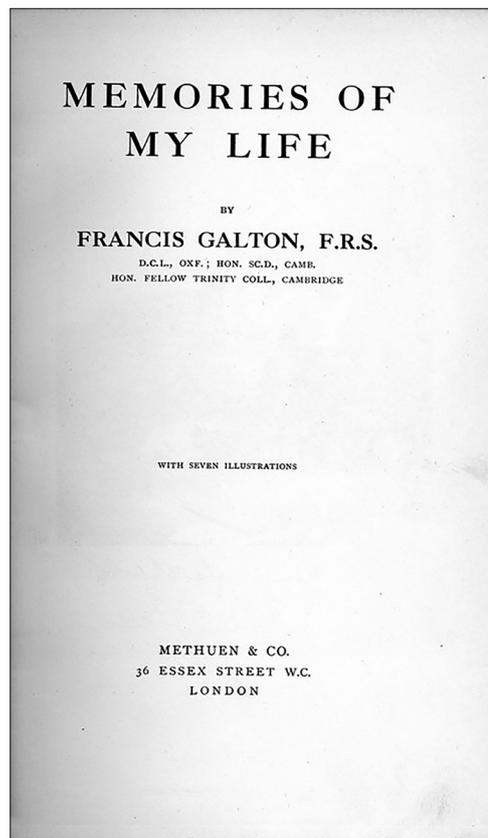


Рис. 5. Автобиография Гальтона (1908 год)

Анализируя автобиографические высказывания великих людей, можно прийти к выводу, что большинство из них считает собственные достижения одним из успехов коллективного интеллектуального творчества как предшественников, так и современников. Вспомним мнение Ньютона о «плечах гигантов», которые помогли ему видеть дальше. Многие нобелевские лауреаты (Корнберг А., Ниренберг М. и др.) аналогично, без ложной скромности говорят о суммарном, коллективном вкладе в раскрытие той или иной истины. Верующие ученые тактично не заостряют вопрос о приоритете, искренне полагая, что знают источник и причины откровений, которые приходят на ум первооткрывателей (например, Листер Дж.). Что касается Гальтона, сделавшего так много в различных областях науки, то он также склоняется к мысли о том, что истина зреет в разных местах и разных умах. Другого и нельзя было ожидать от человека, который вместе со своим великим родственником Дарвином совершили столь беспрецедентные прорывы в науке XIX века.

Из высказаний Гальтона (по-видимому, классику нужно иногда просматривать в оригинале):

- «Я не так легко думаю словами ... после того, как я усердно трудился, достигнув совершенно ясных результатов ... я должен перевести свои мысли на язык, который не всегда соответствует им».

- «Я знаю едва ли что-либо, способное произвести впечатление на воображение, как на чудесную форму космического порядка, выраженную «Законом частоты ошибок». Закон был бы олицетворен греками и обожествлен, если бы они знали об этом. Он правит безмятежно и в полном самоуничтожении, в самой дикой путанице. Чем гуще толпа и чем больше очевидная анархия, тем совершеннее ее господство. Это высший закон неразумности».

- «Известно, что одно и то же открытие часто делается одновременно и совершенно независимо разными людьми. Таким образом, если говорить только о нескольких случаях в последние годы, у открытий фотографии, электрической телеграфии и планеты Нептун посредством теоретических расчетов есть все их претенденты на соперника. Казалось бы, что открытия обычно делаются, когда для них настало время — то есть, когда идеи, из которых они естественным образом вытекают, бродят в умах многих людей».

- «Некоторые люди ненавидят сами определения статистики, но я нахожу их полными красоты и интереса. Всякий раз, когда они не подвергаются жестокому обращению, но деликатно обрабатываются высшими методами и интерпретируются осторожно, их способность справляться со сложными явлениями является исключительной. Они являются единственными инструментами, с помощью которых может быть прорезано отверстие через огромные заросли трудностей, которые пресекают путь тех, кто занимается наукой о человеке».

- «Все, что возможно сосчитать, — считайте!»

- «Публикация Чарльза Дарвина «Происхождение видов» в 1859 году произвела заметную эпоху в моем собственном умственном развитии, как это произошло в человеческом мышлении в целом. Его эффект заключался в том, чтобы одним ударом разрушить множество догматических барьеров и вызвать дух восстания против всех древних авторитетов, чьи позитивные и неаутентифицированные утверждения противоречили современной науке».

- «Следующий вопрос не давал мне покоя. Как может популяция оставаться одинаковой в своих чертах в целом на протяжении многих последовательных поколений, если средний продукт каждой пары похож на их родителей? Их дети не похожи, но различаются».

- «Одним из следствий цивилизации является снижение строгости применения закона естественного отбора».

- «Человек одарен жалостью и другими добрыми чувствами; он также обладает силой предотвращать многие виды страданий. Я полагаю, что в его компетенцию входит замена естественного отбора другими процессами, более милосердными и не менее эффективными. Это и есть цель евгеники. Его первая цель состоит в том, чтобы контролировать уровень рождаемости неприспособленных вместо того, чтобы позволить им появиться на свет, хотя в большом количестве они обречены на преждевременную гибель. Вторая цель — улучшение расы с помощью повышения продуктивности приспособленных за счет ранних браков и здорового воспитания их детей. Естественный отбор основывается на чрезмерном производстве и массовом уничтожении; евгеника — о том, чтобы рожать в мире не больше людей, чем можно должным образом о них позаботиться, и только лучших потомков».

- «Я не терплю время от времени высказываемую и часто подразумеваемую гипотезу, особенно в сказках, написанных для того, чтобы научить детей быть хорошими, что младенцы рождаются очень похожими и что единственными факторами, создающими различия между мальчиком и мальчиком, мужчиной и женщиной, являются постоянное прилежание и моральное усилие. Я самым безоговорочным образом возражаю против притязаний на естественное равенство. Опыт детского сада, школы, университета и профессиональной карьеры — цепь доказательств обратного».

Гальтон и наше время. Научное наследие ученого сохраняет свое развитие. Правда, есть неоднозначные современные формулировки в отношении евгеники, но это, скорее всего, от субъективизма или неглубокого ознакомления с его оригинальными классическими трудами. Основные его выводы в разных научных областях остаются в силе и выдержали испытание двумя столетиями. Критика раздела евгеники происходит главным образом по причине потенциальной поддержки расистских взглядов. Особенно ставится в вину оригинальному автору использование фашистами заключений Гальтона в пропагандистских целях. Хотя проведение дискуссий на материале 100-летней давности — весьма неблагоприятное занятие. Что же касается непосредственно текстов самого автора, то в них все-таки в большей мере проступают элементы позитивной евгеники. Кроме того, ныне существует консолидированное мнение о необходимости грамотного применения устоявшихся главных ее положений,

хотя бы в плане адаптации их к концепциям неоевгеники (правда, сама последняя представляет собой формирующуюся гипотетическую отрасль, в которой много от позитивной евгеники). Имеется в рассматриваемой теме и гносеологический аспект: в прошлом альтернативные точки зрения имели строгую разделительную полосу. Сейчас, в эпоху всепроникновения молекулярной биологии как классифицировать пренатальную диагностику генетического нарушения и показания к последующему прерыванию беременности — это положительная или отрицательная евгеника? Формально — отрицательная, субъективно — трагедия, а на популяционном уровне — носит позитивный (гуманный) характер, поскольку прерывание беременности по медицинским показаниям, к которым относится ряд пренатально диагностированных хромосомных аномалий (в том числе трисомий по разным хромосомам, например, при болезни Дауна) и так называемых моногенных заболеваний, то есть вызванных мутацией в одном конкретном гене, разрешено законом.

Список литературы к настоящей статье подобран из ключевых источников, которые дают возможность основательнее познакомиться с научным вкладом Гальтона [1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 19, 20, 22, 25]. Список его работ и корреспонденций представлен в публикации [11] (www.galton.org/bibliography/galton-ucl-holdings-1up.pdf) и на сайте <https://galton.org/main.html> [23]. Достаточно полный перечень материалов, связанных с его именем, имеется также на сайте [24].

Литература

1. Бабков В.В. Заря генетики человека. Русское евгеническое движение и начало генетики человека. — М.: Прогресс-Традиция, 2008. — 800 с.
2. Воробьев В.С. К 100-летию со дня смерти Фрэнсиса Гальтона — основателя психогенетики // Теор. и эксп. психология. — 2011. — Т. 4. — № 3. — С. 85–100.
3. Гальтон Ф. Наследственность таланта: Законы и последствия / Пер. с англ. — М.: Мысль, 1996. — 272 с.
4. Исследование умственных способностей человека и их наследственной передачи. Электронный ресурс: https://studme.org/148375/psihologiya/issledovanie_umstvennyh_sposobnostey_cheloveka_nasledstvennoy_peredachi. Дата обращения 30.03.2022.
5. Канаев И.И. Фрэнсис Гальтон, 1822–1911. — Л.: Наука, 1972. — 135 с.
6. Кольцов Н.К. Генеалогия Ч. Дарвина и Ф. Гальтона. Речь, произнесенная в торжественном заседании Русского евгенического общества 17 февраля 1922 г. в память столетнего юбилея со дня рождения Фрэнсиса Гальтона // Рус. евгенич. журнал. — 1922. — Т. I. — Вып. I. — С. 64–73.
7. Сэр Фрэнсис Гальтон и его предки. Электронный ресурс: <http://www.socialcompas.com/2021/01/30/frensis-galton-i-ego-predki/>. Дата обращения 30.03.2022.
8. Фрэнсис Гальтон (1822–1911) // В кн.: Шульц Д.П., Шульц С.Э. История современной психологии / Пер. с англ. А.В. Говорунов, В.И. Кузин, Л.Л. Царук. Под ред. А.Д. Наследова. — СПб.: Изд-во «Евразия», 2002. — 532 с.
9. Фрэнсис Гальтон. Электронный ресурс: https://translated.turbopages.org/проху_u/en-ru.ru.d2ef4da4-6248417e-56c6f807-74722d776562/https/psychology.fandom.com/wiki/Francis_Galton. Дата обращения 30.03.2022.
10. Чен Ю.В. Евгеника: Основатели и продолжатели // Человек. — 2006. — № 3. — С. 80–88.
11. A list of the papers and correspondence of Sir Francis Galton (1822–1911) held in Manuscripts Room, the Library, University College, London. Compiled by M. Merrington and J. Golden. — London, Galton Laboratory, University College London, 1976. — iv, 89 p. (см. также на сайте www.galton.org/bibliography/galton-ucl-holdings-1up.pdf).
12. Fancher R. Scientific Cousins: the relationship between Charles Darwin and Francis Galton // Amer. Psychologist. Wash. — 2009. — Vol. 64(2). — P. 84–92. Русский перевод: <https://cyberleninka.ru/article/n/2010-01-015-fancher-r-nauchnye-kuzeny-vzaimootnosheniya-ch-darvina-i-f-galtona-fancher-r-scientific-cousins-the-relationship-between-charles>.
13. Forrest D.W. Francis Galton: The Life and Work of a Victorian Genius. — London: Paul Elek, 1974. — 340 p.
14. Galton F. Hereditary genius: an inquiry into its laws and consequences. — London: Macmillan & Co, 1869. — VI, 390 p. (2nd ed. 1892, reprint 1914, 1950, 1962, 1979).
15. Galton F. Hereditary talent and character // Macmillan's Magazine. — 1865. — Vol. 12. — P. 157–166, 318–327.
16. Galton F. Inquiries into human faculty and its development. — London — New York: Macmillan, 1883. <https://galton.org/books/human-faculty/text/human-faculty.pdf>.
17. Galton F. Memories of my life. — London: Methuen & Co, 1908. — 339 p. <https://galton.org/books/memories/>.
18. Galton F. Tropical South Africa. — London: John Murray, 1853. — 314 p. (Narrative of an Explorer in Tropical South Africa. 2nd ed. Ward, Lock and Co., 1889; 4th ed., 1891. — P. 1–241).
19. Gillham N.W. A life of Sir Francis Galton: From African exploration to the birth of eugenics. — NY: Oxford University Press, 2001. — 432 p.
20. Gillham N.W. Sir Francis Galton and the birth of eugenics // Annu. Rev. Genet. — 2001. — Vol. 35. — P. 83–101. doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090055.
21. Pearson K. The life, letters and labours of Francis Galton: In 3 vols. — London: Cambridge University Press. 1914 (V. 1, 246 p.), 1924 (V. 2, 425 p.), 1930 (V. 3a, 439 p.; V. 3b, P. 440–673). Facsimile <http://galton.org>.

22. Wallis K.F. Revisiting Francis Galton's forecasting competition // *Statistical Science*. — 2014. — Vol. 29. — No. 3. — P. 420–424.
23. <https://galton.org/main.html>.
24. <https://galton.org/>.
25. www.en.wikipedia.org/wiki/Eugenics.
11. A list of the papers and correspondence of Sir Francis Galton (1822–1911) held in Manuscripts Room, the Library, University College, London. Compiled by M Merrington and J Golden. London, Galton Laboratory, University College London, 1976; iv: 89 (sm. takzhe na sayte www.galton.org/bibliography/galton-ucl-holdings-1up.pdf).
12. Fancher R. Scientific Cousins: the relationship between Charles Darwin and Francis Galton. *Amer Psychologist* Wash 2009; 64(2):84–92. Russkiy perevod: <https://cyberleninka.ru/article/n/2010-01-015-fancher-r-nauchnye-kuzeny-vzaimootnosheniya-ch-darvina-i-f-galtona-fancher-r-scientific-cousins-the-relationship-between-charles>.
13. Forrest DW. Francis Galton: The Life and Work of a Victorian Genius. London: Paul Elek, 1974: 340.
14. Galton F. Hereditary genius: an inquiry into its laws and consequences. London: Macmillan & Co, 1869; VI: 390 (2nd ed 1892, reprint 1914, 1950, 1962, 1979).
15. Galton F. Hereditary talent and character. *Macmillan's Magazine* 1865; 12: 157–166, 318–327.
16. Galton F. Inquiries into human faculty and its development. London — New York: Macmillan, 1883. <https://galton.org/books/human-faculty/text/human-faculty.pdf>.
17. Galton F. Memories of my life. London: Methuen & Co, 1908: 339 p. <https://galton.org/books/memories/>.
18. Galton F. Tropical South Africa. London: John Murray, 1853: 314 p. (Narrative of an Explorer in Tropical South Africa. 2nd ed. Ward, Lock and Co., 1889; 4th ed., 1891: 1–241).
19. Gillham NW. A life of Sir Francis Galton: From African exploration to the birth of eugenics. NY: Oxford University Press, 2001: 432.
20. Gillham NW. Sir Francis Galton and the birth of eugenics. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 83–101. doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.090055.
21. Pearson K. The life, letters and labours of Francis Galton: In 3 vols. London: Cambridge University Press. 1914 (V. 1, 246 p.), 1924 (V. 2, 425 p.), 1930 (V. 3a, 439 p.; V. 3b, P. 440–673). Facsimile <http://galton.org>.
22. Wallis KF. Revisiting Francis Galton's forecasting competition. *Statistical Science* 2014; 29(3):420–424.
23. <https://galton.org/main.html>.
24. <https://galton.org/>.
25. www.en.wikipedia.org/wiki/Eugenics.

TO THE 200TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF FRANCIS GALTON

V.S. VOROBYEV

Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Moscow

In connection with the 200th anniversary of the birth of the outstanding English scientist Francis Galton, materials are placed that highlight the main aspects of his work. The emphasis is on biographical data less known in Russian literature.

Keywords: commemorative materials, 200th birthday, Francis Galton.

Address:

Vorobyev V.S., Ph.D.

Researcher of Psychological Institute of RAE

E-mail: vorob_vs@mail.ru

Для цитирования:

Воробьев В.С. К 200-летию со дня рождения Фрэнсиса Гальтона, выдающегося английского ученого-энциклопедиста, основателя евгеники. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(2):71–77.

For citation:

Vorobyev V.S. To the 200th anniversary of the birth of Francis Galton. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(2):71–77 (in Russian).

Памяти В.Т. Иванова
(1937–2022)



8 апреля 2022 года скончался Вадим Тихонович Иванов, крупный ученый, способствовавший на протяжении длительного времени становлению биоорганической химии в нашей стране. Это он делал и как исследователь по воспитанию и образованию, и как руководитель ведущего академического научно-исследовательского учреждения — Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Все это, вместе взятое, обеспечило высокую содержательность и результативность его деятельности.

Вадим Тихонович в 1960 году окончил химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова и начал трудиться в Институте химии природных соединений АН СССР (будущем ИБХ РАН). Он очень гордился тем, что был верен только одному в жизни рабочему месту. Такое постоянство создавало обстановку доминантного интеллектуального напряжения, нацеленного на решение актуальных проблем быстро прогрессирующей науки. При этом следует подчеркнуть интеграцию личного вклада и поддержку коллективного творчества руководимого им научного подразделения и учреждения в целом.

Остановимся вначале на его личных достижениях. Спектр его трудов был довольно широк, среди них работы по биоорганической химии гормонов, токсинов, антибиотиков и антитоксинов. Исследования В.Т. Иванова связаны с химией физиологически активных соединений и белково-пептидных веществ. Им были разработаны методы получения депсипептидов, осуществлены полные химические синтезы природных

депсипептидов и их аналогов. В сотрудничестве с М.М. Шемякиным и Ю.А. Овчинниковым было установлено, что депсипептиды являются химическим инструментом изучения ионного транспорта через мембраны, а также изучены конформационные особенности и механизм действия ионофоров валиномицина и энниатинов. Он открыл способность мембрано-активных комплексов (ионофоров) образовывать липофильные комплексы с ионами металлов, расшифровал их структуру, выяснил причины ионной селективности ионофоров. В.Т. Иванов продемонстрировал возможность регулирования потоков ионов в мембранных системах, определил пространственное строение антибиотика грамицидина С, тканевого гормона брадикинина. Он также занимался синтезом и структурно-функциональным анализом белковых токсинов и иммуноактивных пептидов. Им были разработаны методы синтеза пептидов, обладающих антистрессорной, противоопухолевой и иммуностимулирующей активностью, принимал участие в разработке синтетических вакцин против опасных болезней человека и животных.

Достижения всего института (включая и Пушкинский филиал) трудно охватить, хотя за период его 30-летнего директорства особо нужно выделить линию на фундаментальные, прорывные технологии в сфере молекулярной биологии. Одно время приоритет отдавался нейротоксинам. Правда, имеется и поддерживается практико-ориентированное направление (пептидные препараты, иммунокорректирующие средства).

Ясно, что по традиции научные результаты были соответствующим образом отмечены. В 1976 г. он был избран членом-корреспондентом Академии наук СССР по Отделению биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений, а в 1987 г. — действительным членом АН СССР по тому же отделению. С 1988 г. он становится директором Института биоорганической химии и главным редактором журнала «Биоорганическая химия». Он заведовал кафедрой биоорганической химии биологического факультета МГУ. Был он избран также в 1991 году действительным членом ВАСХНИЛ (ныне — РАСХН).

Иванов В.Т. активно участвовал в жизни Российской академии наук, был руководителем секции физико-химической биологии и заместителем академика-секретаря Отделения биологических наук РАН.

Безусловно, он получил самые разнообразные награды. Из них: Ленинская премия — в 1978 г. за цикл работ по созданию нового класса мембранных биорегуляторов и исследованию молекулярных основ ионного транспорта через биологические мембраны

(совместно с Ю.А. Овчинниковым). Его труды были отмечены Государственной премией СССР в области науки и техники в 1985 году и Премией Правительства РФ — в 1996 году. Памятны также Премия РАН имени Ю.А. Овчинникова и именная Золотая медаль — за цикл работ «Пептидные препараты для медицины и ветеринарии» (1992). Он был удостоен высокой чести присуждения ему Большой золотой медали Российской академии наук имени М.В. Ломоносова (2009). Были и высокие государственные награды (ордена и медали).

Он является автором более 500 работ, ряда авторских свидетельств и патентов.

Оказался представительным и набор его ключевых книг:

1. Овчинников Ю.А., Иванов В.Т., Шкроб А.М. Мембрано-активные комплексы. — М.: Наука, 1974, 464 с.
2. Физико-химические методы исследования биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов. — 1992, под ред. В.Т. Иванова.
3. Белки и пептиды. — 1995, под ред. В.Т. Иванова.
4. Проблема белка (тт. 1–5). — 1995, 1996, 1997, 2000, под ред. В.Т. Иванова:
 - Том 1. Химическое строение белка.
 - Том 2. Пространственное строение белка.
 - Том 3. Структурная организация белка.
 - Том 4. Структура и функция белка.
 - Том 5. Структура, функция и эволюция белка.

Отметим, что В.Т. Иванов был в течение последних двух десятилетий членом редакционного совета журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова». Редколлегия и редсовет журнала скорбят об этой утрате и выражают соболезнование родным и близким покойного.

К 100-летию со дня рождения первооткрывателей генетического кода Х.Г. Кораны и Р.У. Холли

В этом году исполняется 100 лет со дня рождения выдающихся исследователей XX столетия, лауреатов Нобелевской премии Х.Г. Кораны и Р.У. Холли. Они пришли разными путями к своим открытиям, но судьба их объединила вокруг проблемы расшифровки генетического кода вместе с работавшим отдельно от них (тоже порознь) М. Ниренбергом.

Наш журнал уже помещал биографические данные об обоих этих ученых. Поэтому в настоящем материале будет затрагиваться только аспект, связанный с их ролью

в расшифровке генетического кода. При этом роль других участников указанного процесса (Крик, Ниренберг, Очоа и др.) не будет рассматриваться. Знаменитый Фрэнсис Крик в 1966 году заявил: «Обнаружение генетического кода действительно является великим достижением. Это, в определенном смысле, ключ к молекулярной биологии, потому что это показывает, как связаны друг с другом два великих полимерных языка: язык нуклеотидов и язык белков».

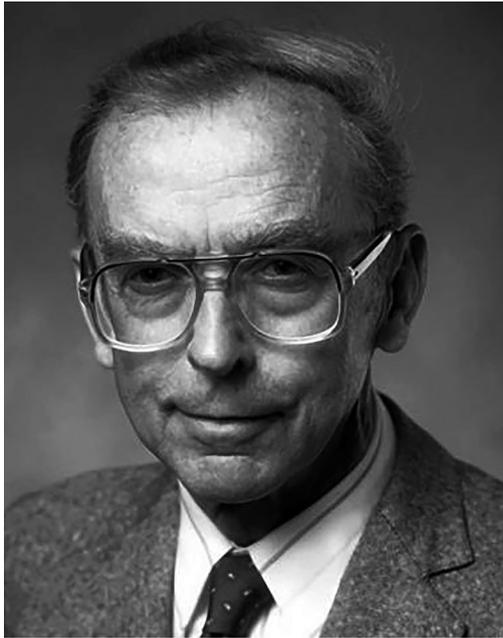


Хар Гобинд Корана (1922–2011)

Индийский химик Х.Г. Корана приступил к работе в данном направлении, имя за плечами хорошую школу в лабораториях выдающихся химиков Владимира Прелога и Александра Тодда. Его предшественниками были М. Ниренберг с коллегами, прочитавшими в начале 1960-х годов первую букву генетического кода, введя РНК из одного урацила и получив белок из одного фенилаланина. Корана сумел прочесть все остальные. Однако, синтезировав все 64 триплета, Корана убедился, что часть аминокислот кодируется несколькими триплетами, некоторые «кодоны» молчат, а другие дают сигнал к началу и окончанию синтеза белка (это — «старт-кодоны» и «стоп-кодоны»). Кроме того, им была установлена вторичная структура тРНК.

Естественно, что Хар Гобинд Корана стал одной из ключевых фигур в расшифровке генетического кода, и поэтому оказался в числе реальных кандидатов для получения Нобелевской премии. Вместе с ним в 1968 году Нобелевскую премию по физиологии и медицине получили Маршалл Ниренберг и Роберт Холли.

Представляя Корану, Петер Рейхард из Каролинского института сказал: «Химическая структура нуклеиновых кислот определяет химическую структуру белка, а алфавит нуклеиновых кислот — алфавит белков. Генетический код — это словарь, благодаря которому возможен переход с одного алфавита на другой. А синтез нуклеиновых кислот, осуществленный Кораной, является необходимым условием для окончательного решения проблемы генетического кода».



Роберт Холли (1922–1993)

Как уже упоминалось, базовой работой в ходе расшифровки генетического кода явилось исследование М. Ниренберга 1960 года, раскрывшее генетический код матричной РНК. Дальше стояла задача решить вопрос о подборе аминокислот в рибосоме для строительства белка. При этом нужно было предусмотреть необходимый порядок их вставки. Ее предстояло решить американскому молекулярному биологу Роберту Холли. Эта наука тогда бурно развивалась, и данному ученому

удалось сравнительно быстро справиться с актуальной преемственной задачей — расшифровкой строения индивидуальных транспортных рибонуклеиновых кислот (т-РНК).

В 1964 году Холли стал профессором и руководителем отделов химии и молекулярной биологии Корнелльского университета. А уже в 1965 году в журнале «Science» вышла статья Р. Холли с 6 соавторами о структуре аланиновой т-РНК. Работа под названием «Структура рибонуклеиновой кислоты» была помещена в рубрике «Краткие сообщения». В резюме о ней было сказано: «Определена первая полная нуклеотидная последовательность аланиновой транспортной РНК, выделенной из дрожжей. Это первая нуклеиновая кислота, структуру которой удалось узнать». Через 3 года Холли был представлен к Нобелевской премии за эту работу.

Кроме того, Холли сумел показать и вторичную структуру РНК в виде трилистника (листа клевера), центральный «лепесток» которого содержит антикодоны. Благодаря такому механизму эта т-РНК с нужной аминокислотой «пристраивается» в рибосоме в необходимое место на м-РНК, несущую инструкцию о последовательности соединения аминокислот в белке.

При вручении Холли Нобелевской премии представитель Каролинского института Петер Рейхард нашел подходящие слова для обозначения его роли в решении общей проблемы генетического кода тремя лауреатами, подчеркнув, что он «является одним из первооткрывателей специального типа нуклеиновой кислоты, которая... обладает способностью считывать генетический код и переводит его в белковый алфавит. Исследование Холли представляет собой первое определение полной химической структуры биологически активной нуклеиновой кислоты. Расшифровка генетического кода и выяснение его функции являются основными достижениями за последние 20 лет интенсивно развивающейся молекулярной биологии».

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 квадратных скобках, например: [1, с. 277]. Использование автоматических постраничных ссылок не допускается. Список литературы

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

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



Подписано к печати 27.06.2022
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

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