

**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@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Founder and Publisher:

ANO «Information and Analytical Center  
medical and social problems»

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

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

E-mail: raifvasilov@mail.ru

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

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Васильев* ..... 7

**Оригинальные статьи**

- Применение тангенциальной ультрафильтрации в производстве диагностических бактериофагов.  
*А.К. Никифоров, М.В. Овчинникова, А.В. Комиссаров, О.С. Зинина,  
К.С. Гумаюнова, Ю.В. Синягина* ..... 8
- Обоснование применения энтеросорбентов на базе недревесного растительного сырья в ветеринарной  
практике.  
*И.А. Гнеушева, И.Ю. Солохина, А.В. Лушников, Н.Ю. Агеева* ..... 14
- Оптимизация технологии производства пробиотика на основе споровых бактерий *Bacillus pumilus*  
b-13250 и *Bacillus toyonensis* b-13249.  
*И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова, А.В. Малкова, М.В. Ширманов, Д.Е. Дудник* ..... 20
- Изменение кишечного профиля микробиоты и иммунологических показателей в результате внесения  
пробиотиков в рацион цыплятам-бройлерам.  
*С.В. Сидоренко, Г.Ф. Рыжкова* ..... 28
- Физико-химические свойства наночастиц фукоидан/магнетит, загруженных модельным ферментом.  
*В.Е. Супрунчук* ..... 35
- Конструирование конъюгатов на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с метками  
ФИТЦ и Alexa Fluor и оценка возможности их применения в исследованиях на клеточных культурах.  
*Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, Т.Ю. Кириллова, М.Н. Киреев, А.Н. Спицын* ..... 39
- Использование ферментных препаратов при производстве спирта с дрожжами местной селекции.  
*Н.Ф. Бирагова, Н.А. Тиникашвили, Д.А. Бирагов* ..... 46
- Растения – ингибиторы бактерий *Pseudomonas fluorescens*.  
*Е.С. Яценко, Е.А. Лейтес, В.А. Петухов, А.А. Петухов,  
А.В. Ермакова, Ю.А. Потапкина, С.И. Красникова* ..... 51
- Получение субстанции имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*.  
*Н.В. Котова, И.А. Красовицкая, А.В. Гусев, Д.Р. Зайретдинова* ..... 57
- Сравнительная оценка антибактериальной активности эфирных масел *Thymus serpyllum* L., *Thymus  
marshallianus* Willd. и *Pimpinella anisum* L. в отношении грамотрицательных бактерий – возбудителей  
уроинфекций у беременных женщин.  
*О.Г. Шаповал, А.С. Шереметьева, Н.А. Дурнова, Н.К. Мухамадиев,  
Г.Т. Раббимова, М.Х. Назирбеков* ..... 63

**Обзоры**

- Использование бактериофагов в терапии и профилактике особо опасных инфекций.  
*Н.Е. Гаевская, А.В. Тюрина, А.А. Труфанова, А.В. Филиппенко,  
И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, М.П. Погужова, А.О. Аноприенко* ..... 70
- Современное состояние производства биотоплива из биомассы микроводорослей.  
*П.К. Потапов, И.В. Маркин, И.А. Зайцев* ..... 79
- Применение линий клеток кишечника человека в исследовании *Vibrio cholerae*.  
*О.А. Якушева, Л.П. Алексеева, В.В. Евдокимова, В.П. Зюзина, Д.И. Симакова* ..... 91

---

**Страницы истории**

К 150-летию со дня рождения Н.К. Кольцова (1872–1940).

*В.С. Воробьев* ..... 103

**Хроника** ..... 110

**Правила для авторов** ..... 111

**CONTENTS**

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

To readers. R.G. Vasilov ..... 7

**Original articles**

- Application of tangential ultrafiltration in the production of diagnostic bacteriophages.  
*A.K. Nikiforov, M.V. Ovchinnikova, A.V. Komissarov,*  
*O.S. Zinina, K.S. Gumayunova, Yu.V. Sinyagina*..... 8
- Justification of the use of enterosorbents based on non-woody plant raw materials in veterinary practice.  
*I.A. Gneusheva, I.Yu. Solokhina, A.V. Lushnikov, N.Yu. Ageeva*..... 14
- Optimization of probiotic production technology based on spore-forming bacteria *Bacillus pumilus* B-13250 and *Bacillus toyonensis* B-13249.  
*I.Yu. Evdokimov, A.N. Irkitova, A.V. Malkova, M.V. Shirmanov, D.E. Dudnik*..... 20
- Changes in the intestinal microbiota profile and immunological parameters as a result of the administration of probiotics in the diet for broiler chickens.  
*S.V. Sidorenko, G.F. Ryzhkova* ..... 28
- Physicochemical properties of fucoidan/magnetite nanoparticles loaded with a model enzyme.  
*V.E. Suprunchuk* ..... 35
- Construction of conjugates based on antibodies to rabies virus ribonucleoprotein with FITC and Alexa Fluor fluorochromes and evaluation of the possibility of their use in cell culture studies.  
*Yu.K. Gavrilova, S.V. Generalov, E.G. Abramova, T.Yu. Kirillova, M.N. Kireev, A.N. Spicyn* ..... 39
- The use of enzyme preparations in the production of alcohol with local selection of yeast.  
*N.F. Biragova, N.A. Tinikashvili, D.A. Biragov* ..... 46
- Plants – inhibitors of bacteria *Pseudomonas fluorescens*.  
*E.S. Yatsenko, E.A. Leites, V.A. Petukhov, A.A. Petukhov,*  
*A.V. Ermakova, Yu.A. Potapkina, S.I. Krasnikova* ..... 51
- Obtaining the imbricin substance from the culture liquid of *Streptomyces imbricatus*.  
*N.V. Kotova, I.A. Krasovitskaya, A.V. Gusev, D.R. Zayretdinova*..... 57
- Comparative evaluation of the antibacterial activity of the essential oils of *Thymus serpyllum* L., *Thymus marshallianus* Willd. and *Pimpinella anisum* L. against gram-negative bacteria that cause uroinfections in pregnant women.  
*O.G. Shapoval, A.S. Sheremetyeva, N.A. Durnova, N.K. Mukhamadiev,*  
*G.T. Rabbimova, M.Kh. Nazirbekov* ..... 63

**Reviews**

- The use of bacteriophages in the therapy and prevention of particularly dangerous infections.  
*N.E. Gaevskaya, A.V. Tyurina, A.A. Trufanova, A.V. Filippenko,*  
*I.A. Ivanova, N.D. Omelchenko, M.P. Pogozhova, A.O. Anoprienko* ..... 70
- Current state of biofuel production from microalgae biomass.  
*P.K. Potapov, I.V. Markin, I.A. Zaitsev* ..... 79
- Application of human intestinal cell lines in the study of *Vibrio cholerae*.  
*O.A. Yakusheva, L.P. Alekseeva, V.V. Evdokimova, V.P. Zyuzina, D.I. Simakova* ..... 91

---

**Pages of history**

To the 150<sup>th</sup> anniversary of the birth of N.K. Koltsov (1872–1940).

*V.S. Vorobyev* ..... 103

**The chronicle** ..... 110

**Rules for authors** ..... 111

## К читателям

В третьем номере представлен широкий спектр тематики и участия различных регионов. Всего включено 10 оригинальных статей и 3 обзора.

В статье Никифорова А.К. с коллегами (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов) рассмотрены практические аспекты применения метода тангенциальной ультрафильтрации в производстве препаратов на основе бактериофагов для диагностики возбудителей опасных инфекций. Коллектив авторов из Саратовского аграрного государственного университета (Гнеушева И.А. и др.) изучили антитоксическое действие энтеросорбентов на основе недревесного растительного сырья из соломы овса, гречихи и ржи. Евдокимовым И.Ю. и др. (Алтайский государственный университет, Барнаул) оценена эффективность совместного и отдельного культивирования *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249.

Сидоренко С.В., Рыжкова Г.Ф. из Курской государственной сельскохозяйственной академии исследовали влияние внесения в рацион цыплятам-бройлерам пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4» на профиль кишечной микробиоты. Супрунчук В.Е. (Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь) показана возможность создания наночастиц на основе фукоидана, модифицированного магнетитом, применимых при разработке адресных систем доставки. Специалисты из учреждений Саратова (Гаврилова Ю.К. и др.) сконструировали флуоресцирующие конъюгаты на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства «Москва 3253Vero» с флуорохромами ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм).

В работе Н.Ф. Бираговой и др. (Владикавказ) установлены основные оптимальные условия для брожения просяного суслу  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=4,5-5,3$ . Группа специалистов из Алтайского государственного университета (Яценко Е.С. и др.) публикуют результаты исследования ингибиторной активности растений на штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Котова Н.В. с коллегами (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет) разработали схему выделения и очистки антибиотика немедицинского назначения имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*.

Авторский коллектив из учреждений Саратова и Республики Узбекистан (Шаповал О.Г. и др.) провел сравнительную оценку антибактериальной активности эфирных масел тимьянов *Thymus serpyllum* L., *Thymus marshallianus* Willd. и *Pimpinella anisum* L. в отношении штаммов уропатогенных грамотрицательных бактерий, выделенных от беременных женщин.

Обзоры представлены тремя группами. Специалисты из Ростовского-на-Дону противочумного института (Гаевская Н.Е. и др.) осуществили обзор литературы по использованию бактериофагов в терапии и профилактике особо опасных инфекций. Другая группа работников того же института (Якушева О.А. и др.) систематизировала сведения о клеточных линиях кишечника человека, которые применяют как альтернативу биомоделям для получения новых сведений о холерных вибрионах. Исследователи из Анапы (Потапов П.К. и др.) рассмотрели потенциальные возможности производства биотоплива третьего поколения с применением зеленых микроводорослей, способных расти на доступных и дешевых отходах пищевого и коммунального хозяйства.

В заключение помещены исторические материалы к 150-летию со дня рождения выдающегося отечественного биолога Николая Константиновича Кольцова (1872–1940).

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

## ПРИМЕНЕНИЕ ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

А.К. НИКИФОРОВ, М.В. ОВЧИННИКОВА, А.В. КОМИССАРОВ,  
О.С. ЗИНИНА, К.С. ГУМАЮНОВА\*, Ю.В. СИНЯГИНА

*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов*

Рассмотрены практические аспекты применения метода тангенциальной ультрафильтрации в производстве препаратов на основе бактериофагов для диагностики возбудителей опасных инфекций. Изучены параметры барометрического процесса — степень концентрирования, давление, номинальная отсечка по молекулярной массе ультрафильтрационных мембран и качество целевых продуктов, время проведения процедуры. Показана возможность применения тангенциальной ультрафильтрации в решении проблемы низкой репродуктивности маточных линий бактериофагов и получения целевого продукта в концентрациях, соответствующих требованиям нормативной документации.

*Ключевые слова:* ультрафильтрация, бактериофаги, концентрирование.

### Введение

Бактериофаги нашли широкое применение во многих сферах деятельности человека благодаря своей высокой специфичности, технической доступности постановки анализа и экспрессности метода. Они по-прежнему остаются актуальными в лечении и профилактике инфекционных болезней, индикации и идентификации их возбудителей [5].

Основопологающим аспектом изготовления фаговых препаратов, обеспечивающих высокую специфическую активность готового препарата диагностических бактериофагов, является качество посевного материала — маточных культур фагов.

Маточные культуры фагов — жидкие специфически стерильные фагофильтраты бульонных культур микроорганизмов, содержащие взвесь частиц соответствующих фагов. Каждая маточная культура имеет ограниченный срок хранения, по истечении которого у части фагов констатируется уменьшение содержания активных частиц. Также отмечено, что при использовании маточного фага с высокой активностью при получении полуфабрикатов диагностических препаратов (фаго-

фильтратов), в силу ряда причин, выращенный продукт может характеризоваться низкой урожайностью фаговых частиц, приводящей к потере специфических свойств — активности и специфичности.

Традиционный трудоемкий процесс концентрирования бактериофагов на плотных питательных средах привел к поиску альтернативных методик, позволяющих не только упростить, но и повысить эффективность процесса получения фагового потомства в стабильно высоких концентрациях. Решить проблему получения фагового материала с необходимыми концентрациями даст возможность метод тангенциальной (кросс-флоу) ультрафильтрации, который является одним из перспективных методов фильтрации в тангенциальном режиме на установках с плоскорамными фильтрующими элементами с использованием мембран, оптимально соответствующих молекулярной массе получаемого продукта.

Ультрафильтрация — это процесс мембранного разделения, при котором из раствора отделяются молекулы и частицы размером от 10 до 200 Å [3]. Технология кросс-флоу достаточно широко применяется для очистки и концентрирования целевых продуктов (белка, клеточного супернатанта, различных вирусов) при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов [1, 6]. Комплексное применение каскада микрофильтрации и ультрафильтрации фаголизатов микроорганизмов IV групп патогенности для извлечения балластных веществ из полупродуктов (остатков питательной среды, белков, метаболитов бактерий) обеспечивает возможность получать высокоочищенные препараты, пригодные для парен-

© 2022 г. Никифоров А.К., Овчинникова М.В., Комиссаров А.В., Зинина О.С., Гумаюнова К.С., Синягина Ю.В.

\* Автор для переписки:

Гумаюнова Кристина Сергеевна  
младший научный сотрудник лаборатории диагностических препаратов, ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов  
E-mail: kristina.gumayunova@gmail.com



терального введения [2, 4]. Однако ультрафильтрация фаголизатов бактериофагов, специфичных в отношении возбудителей опасных инфекций (ПБА I—III групп патогенности), для получения фагофильтратов с высоким содержанием БОЕ/мл до настоящего времени не нашла широкого применения в биотехнологической практике. При этом следует учитывать, что уменьшение объема фагофильтрата бульонных культур опасных инфекций позволяет получить пропорциональное увеличение концентрации фаговых частиц на единицу объема.

## Материалы и методы

В эксперименте использовали установку тангенциальной ультрафильтрации, состоящую из фильтрационного модуля Vivaflow 200 и перистальтического насоса Masterflex с регулируемой скоростью. Выбор в пользу установки Vivaflow 200 был обусловлен ее высокой надежностью, эффективностью и производительностью. При необходимости существует возможность подключения двух и более одинаковых модулей для быстрого концентрирования большого объема растворов в 50 раз; практически полного извлечения образца из большинства жидкостей («мертвый» объем составляет менее 500 мкл). Немаловажно, что конструкция канала контура рециркуляции может обеспечить высокие скорости процесса фильтрации/концентрирования при минимальных требованиях, предъявляемых к мощности используемого насоса. Прозрачный дизайн корпусов модуля предоставляет возможность контроля как фильтровальной жидкости, так и состояния мембраны.

С целью апробации методики, позволяющей эффективно осуществлять концентрацию маточных культур бактериофагов, специфичных в отношении возбудителей опасных инфекций I—III групп патогенности, была проведена серия экспериментов по концентрированию фагофильтратов бульонной культуры *Y. pseudotuberculosis*.

Предварительное выращивание штамма-продуцента *Y. pseudotuberculosis* 158 (1) осуществляли в жидкой питательной среде — бульоне Хоттингера, рН  $7,2 \pm 0,1$  при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение  $23 \pm 1$  ч. В жидкую питательную среду засеивали бульонную культуру *Y. pseudotuberculosis* 158 (1) и маточный псевдотуберкулезный бактериофаг с известным титром из расчетного соотношения: в 1 мл жидкой питательной среды —  $5 \times 10^9$  микробных клеток культуры и  $5 \times 10^8$  БОЕ/мл. Полученную смесь инкубировали при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение  $23 \pm 1$  ч. В целях соблюдения требований биологической безопасности фаголизат подвергали

стерилизующей фильтрации с дальнейшей постановкой контроля специфической стерильности. В дальнейшем эксперименте использовали специфически стерильный фагофильтрат.

В ходе проведения опытов по концентрированию фагофильтрата псевдотуберкулезного бактериофага подбирали оптимальные значения показателей процесса тангенциальной ультрафильтрации.

Проводили экспериментальное концентрирование фагофильтратов через фильтрующие модули с материалом мембран из полиэтиленсульфона (ПЭС) с НОММ 50, 100 и 200 кДа. Значение давления на линии возврата концентрируемого продукта составляло 0,15 МПа. Для определения оптимального номинального объема фильтруемой жидкости с целью получения высоких значений БОЕ/мл исследовали фагофильтраты *Y. pseudotuberculosis* 158 (1) в количестве 1,0, и 5,0 л, концентрирование проводили до уменьшения объемов исходных жидкостей в 2 и 10 раз соответственно. Эффективность баромембранного процесса определяли по изменению содержания количества фаговых частиц (БОЕ/мл) в полученных концентратах относительно количества фаговых частиц, содержащихся в исходном продукте, двуслойным методом по Грациа, наличию (отсутствию) фаговых частиц в отсекаемых жидкостях методом фаговой дорожки (метод Фишера) и по значению средней скорости потока.

Применяя ранее полученные оптимальные значения начального объема фагофильтрата (л), средней скорости потока (мл/мин) и номинальной отсечки по молекулярной массе (НОММ) для используемых мембран, определяли возможность использования концентрирования тангенциальной фильтрацией фагофильтратов бульонных культур, специфичных в отношении возбудителей опасных инфекций (I—III групп патогенности), для получения полуфабрикатов, отвечающих требованиям нормативной документации.

Для изучения возможности применения тангенциальной ультрафильтрации при производстве бактериофагов, специфичных в отношении возбудителей опасных инфекций (I—III групп патогенности), провели серию экспериментов на фильтратах 182/154 фага бульонной культуры *V. cholerae* 145 классического биовара; Л-413С бульонной культуры *Y. pestis* EV, фильтрата псевдотуберкулезного фага бульонной культуры *Y. pseudotuberculosis* 158 (1). Объем каждого исходного образца составлял 5 л, уменьшение количества жидкости проводили в 100 раз — до 50 мл. Применяли фильтрационный модуль с мембраной

НОММ 100 кДа, средняя скорость потока — 50,2 мл/мин.

Эффективность процесса концентрирования определяли изменением количества фаговых частиц в полученных концентратах двуслойным методом по Грациа. Отсутствие (наличие) фаговых частиц в отсекаемой жидкости определяли методом фаговой дорожки (метод Фишера). В целях соблюдения требований биологической безопасности фаголизат подвергали стерилизующей фильтрации с дальнейшей постановкой контроля специфической стерильности.

Были проведены эксперименты с фильтратом фага 184/152 бульонной культуры *V. cholerae* 145 классического биовара. Выращивание штамма-продуцента *V. cholerae* 145 классического биовара осуществляли в жидкой питательной среде — бульоне Хоттингера, рН 7,6 при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение 4 часов. В жидкую питательную среду засеивали бульонную *V. cholerae* 145 классического биовара и маточный бактериофаг 184/152 из расчетного соотношения: на 1 мл бульона Хоттингера рН  $7,6 \pm 0,1$  посевная доза культуры составляла  $6 \times 10^6$  микробных клеток и  $6 \times 10^6$  фаговых частиц. Полученную смесь инкубировали при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение 4 часов.

При выращивании бактериофага Л-413С использовали штамм-продуцент *Y. pestis* EV. Засев

бактериофага и культуры в жидкую питательную среду — бульон Хоттингера рН  $7,2 \pm 0,1$  проводили из расчета  $5 \times 10^5$  микробных клеток и  $2 \times 10^5$  фаговых частиц на 1 мл питательной среды.

Лизат псевдотуберкулезного бактериофага бульонной культуры *Y. pseudotuberculosis* 158 (1) получали инкубированием смеси бульонной культуры *Y. pseudotuberculosis* 158 (1) и маточного псевдотуберкулезного бактериофага из расчетного соотношения:  $5 \times 10^9$  микробных клеток культуры и  $5 \times 10^8$  фаговых частиц на 1 мл жидкой питательной среды.

## Результаты и обсуждение

Результаты определения эффективности концентрирования фагофильтратов бульонной культуры *Y. pseudotuberculosis* 158 (1) в зависимости от НОММ мембран представлены в таблице 1. При анализе полученных данных установлено:

- применение мембран с НОММ 200 кДа нецелесообразно в силу того, что в отсекаемой жидкости обнаруживаются фаговые частицы;
- наиболее эффективным является применение фильтрационного модуля с мембраной с НОММ 100 кДа: в сравнении с мембраной с НОММ 50 кДа средняя скорость потока выше практически в 5 раз.

Таблица 1

### Эффективность концентрирования фагофильтратов бульонной культуры *Y. pseudotuberculosis* 158 (1)

Определяемые параметры	Значения НОММ, кДа								
	50			100			200		
	И*	К**	О***	И	К	О	И	К	О
Номинальный объем фагофильтрата 1,0 л (уменьшение объема — в 10 раз)									
Количество фаговых частиц (БОЕ/мл)	$5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	отсутствует	$5 \times 10^7$	$2 \times 10^8$	отсутствует	$5 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	15 фаговых корпускул
Средняя скорость потока (мл/мин)	10,4			50,2			76,0		
Номинальный объем фагофильтрата 5,0 л (уменьшение объема — в 100 раз)									
Количество фаговых частиц (БОЕ/мл)	$5 \times 10^7$	$3,8 \times 10^9$	отсутствует	$5 \times 10^7$	$2,4 \times 10^9$	отсутствует	$5 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$	21 фаговая корпускула
Средняя скорость потока (мл/мин)	10,4			50,2			76,0		

Примечание: \* — исходные фагофильтраты; \*\* — концентраты фаголизатов; \*\*\* — отсекаемая жидкость

Результаты концентрирования фагофильтратов бульонных культур, специфичных в отношении возбудителей опасных инфекций (I–III групп патогенности), представлены в таблице 2.

При сравнительном анализе показателей исходных фагофильтратов, концентратов фаголизатов и отсекаемой жидкости, представленных в таблице 2, установлено:

- при уменьшении объема концентрируемых фаговых фильтратов в 100 раз происходит увеличение концентрации фаговых частиц в 100 раз;
- полученные концентраты фаговых лизатов отвечают всем необходимым требованиям нормативной документации по показателю количества фаговых частиц.

Таблица 2

**Эффективность концентрирования фагофильтратов бульонных культур, специфичных в отношении возбудителей опасных инфекций (I–III групп патогенности)**

Фагофильтрат	Количество фаговых частиц, БОЕ/мл		
	Исходный фагофильтрат	Концентрат фагофильтратов	Отсекаемая жидкость
Фагофильтрат бульонной культуры <i>V. cholerae</i> 145 классического биовара	$8 \times 10^5$	$2 \times 10^7$	отсутствует
	$7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^7$	отсутствует
	$6,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$	отсутствует
	$6 \times 10^5$	$3 \times 10^7$	отсутствует
Согласно требованиям нормативной документации, готовый препарат должен содержать не менее $1 \times 10^7$ фаговых частиц в 1 мл			
Фагофильтрат	Количество фаговых частиц, БОЕ/мл		
	Исходный фагофильтрат	Концентрат фагофильтратов	Отсекаемая жидкость
Фагофильтрат бульонной культуры <i>Y. pestis</i> EV	$5 \times 10^3$	$3 \times 10^5$	отсутствует
	$7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^5$	отсутствует
	$8 \times 10^3$	$4 \times 10^5$	отсутствует
	$7 \times 10^3$	$3 \times 10^5$	отсутствует
Согласно требованиям нормативной документации, готовый препарат должен содержать не менее $1 \times 10^5$ фаговых частиц в 1 мл			
Фагофильтрат	Количество фаговых частиц, БОЕ/мл		
	Исходный фагофильтрат	Концентрат фагофильтратов	Отсекаемая жидкость
Фагофильтрат бульонной культуры <i>Y. pseudotuberculosis</i> 158 (1)	$8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^7$	отсутствует
	$7,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^7$	отсутствует
	$6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$	отсутствует
	$7,8 \times 10^5$	$4 \times 10^7$	отсутствует
Согласно требованиям нормативной документации, готовый препарат должен содержать не менее $1 \times 10^7$ фаговых частиц в 1 мл			

**Заключение**

Таким образом, результаты, добытые в ходе проведения экспериментов, показывают принципиальную возможность применения ультрафильтрации в тангенциальном потоке для получения полуфабрикатов диагностических бактериофагов.

Следует отметить, что применение тангенциальной ультрафильтрации при производстве бактериофагов, специфичных в отношении возбудителей опасных инфекций

(I–III групп патогенности), для повышения содержания фаговых частиц (БОЕ/мл) возможно только при значительном объеме исходного фагофильтрата.

Данный методический прием может быть использован как в производстве диагностических фаговых препаратов, при поддержании коллекции маточных культур бактериофагов, так и применяться при проведении научных изысканий, связанных с поисками новых бактериофагов и совершенствованием существующих.

**Литература**

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина // Пробл. особо опасных инфекций. — 2016. — № 2. — С. 95–101.
2. Байгузина Ф.А., Киняпина Н.Л., Исрафилов А.Г., Лютов А.Г. Способ выделения бактериофагов. Патент РФ № 2109055, опубл. 20.04.1998.
3. Брахт К., Каталевский Е.Е., Савельева С.П. Фильтрация кросс-флоу // Фармацевтические технологии и упаковка. — 2009. — № 6. — С. 47–51.
4. Ворошилова Н.Н., Казакова Т.Б., Горбаткова Г.А., Боговазова Г.Г., Афанасьева Э.В., Бондаренко В.М. Способ получения пибактериофага. Патент РФ № 2036232, опубл. 27.05.1995.
5. Каттер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение / Пер. с англ.: коллектив пер. Науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. — М: Науч. мир, 2012. — 636 с.
6. Комиссаров А.В., Алешина Ю.А., Громова О.В., Никифоров А.К., Еремин С.А., Волох О.А., Лобовикова О.А., Перепелица А.И. Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов // Пробл. особо опасных инфекций. — 2015. — № 1. — С. 79–84.

**References**

1. Abramova YeG, Generalov SV, Matveyeva ZHV, Zhulidov IM, Nikiforov AK, Komissarov AV. Eksperimental'noye obosnovaniye vnedreniya kul'tural'nykh tekhnologiy v proizvodstvo antirabicheskogo immunoglobulina. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2016; 2:95–101 (in Russian).
2. Bayguzina FA, Kinyapina NL, Israfilov AG, Lyutov AG. Sposob vydeleniya bakteriofagov. Patent RF № 2109055, opubl. 20.04.1998 (in Russian).
3. Brakht K, Katalevskiy YeYe, Savel'yeva SP. Fil'tratsiya kross-flou. Farmatsevticheskiye tekhnologii i upakovka 2009; 6:47–51 (in Russian).
4. Voroshilova NN, Kazakova TB, Gorbatkova GA, Bogovazova GG, Afanas'yeva EV, Bondarenko VM. Sposob polucheniya piobakteriofaga. Patent RF № 2036232, opubl. 27.05.1995 (in Russian).
5. Katter E, Sulakvelidze A. Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoye primeneniye. Per s angl: kolektiv per. Nauch red rus izd AV Letarov. Moscow: Nauch mir, 2012: 636 (in Russian).
6. Komissarov AV, Aleshina YuA, Gromova OV, Nikiforov AK, Yeremin SA, Volokh OA, Lobovikova OA, Perepelitsa AI. Primeneniye ul'trafil'tratsii dlya kontsentrirvaniya i ochistki antigenov. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2015; 1:79–84 (in Russian).

## APPLICATION OF TANGENTIAL ULTRAFILTRATION IN THE PRODUCTION OF DIAGNOSTIC BACTERIOPHAGES

A.K. NIKIFOROV, M.V. OVCHINNIKOVA, A.V. KOMISSAROV,  
O.S. ZININA, K.S. GUMAYUNOVA, Yu.V. SINYAGINA

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

The practical aspects of the application of the method of tangential ultrafiltration in the production of preparations based on bacteriophages for the diagnosis of pathogens of dangerous infections are considered. The parameters of the barometric process were studied: the degree of concentration, pressure, nominal cutoff by molecular weight of ultrafiltration membranes and the quality of the target products, the time of the procedure. The possibility of using tangential ultrafiltration in solving the problem of low reproduction of bacteriophage uterine lines and obtaining the target product in concentrations that meet the requirements of regulatory documentation is shown.

*Keywords:* ultrafiltration, bacteriophages, concentration.

**Address:**

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

**Для цитирования:**

Никифоров А.К., Овчинникова М.В., Комиссаров А.В., Зинина О.С., Гумаюнова К.С., Сиягина Ю.В. Применение тангенциальной ультрафильтрации в производстве диагностических бактериофагов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):8–13.

**For citation:**

Nikiforov A.K., Ovchinnikova M.V., Komissarov A.V., Zinina O.S., Gumayunova K.S., Sinyagina Yu.V. Application of tangential ultrafiltration in the production of diagnostic bacteriophages. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):8–13 (in Russian).

## ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ НА БАЗЕ НЕДРЕВЕСНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ВЕТЕРИНАРНОЙ ПРАКТИКЕ

И.А. ГНЕУШЕВА, И.Ю. СОЛОХИНА\*, А.В. ЛУШНИКОВ, Н.Ю. АГЕЕВА

ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», Орел

В статье приведены исследования по применению энтеросорбентов на основе недревесного растительного сырья из соломы овса, гречихи и ржи. Установлена высокая сорбционная способность энтеросорбентов на основе соломы гречихи при контакте с маркерными модельными растворами метиленового синего и желатина. Эффективность лечебного и профилактического действия энтеросорбентов изучали на белых лабораторных мышках, зараженных острым эшерихиозом. Показано, что применение энтеросорбента на основе соломы гречихи указывает на потенциальную возможность удаления токсинов различной природы.

**Ключевые слова:** энтеросорбенты, солома, овес, рожь, ячмень, *E. coli*, эшерихиоз, сорбционная активность.

### Введение

В настоящее время отходы сельскохозяйственного производства (недревесное растительное сырье) не находят должного применения в производстве. Потенциал данного сырья используют нерационально. Большая часть отходов либо складывается в отвалы, либо сжигается, остальную часть запахивают или используют в подсобном хозяйстве.

Приоритетное направление переработки соломы овса (*Avena sativa* L.), гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench.), ржи (*Secale sp.*) и пшеницы (*Triticum sp.*), в том числе недревесных отходов сельскохозяйственного производства, — это создание сорбентов на основе пшеничных отрубей, свекловичного жома, которые поглощают тяжелые и радиоактивные металлы [7, 8], а также для очистки природных сред, таких как сточные воды, газовые выбросы, грунт [1, 9].

В ветеринарии для удаления токсинов различного рода используется энтеросорбция, которая является актуальной областью применения сорбентов, содержащих в своей основе недревесное растительное сырье [4, 10].

Наиболее распространенным отходом сельскохозяйственного производства представляется недревесное сырье, что обуславливает целесообразность использования этого потенциала для получения энтеросорбентов как перспективного, доступного и дешевого субстрата. И, действительно, солома овса, гречихи, ржи и пшеницы богата значительным количеством лигнина, характеризуется высокой долей целлюлозы, гемицеллюлозы.

Перспективно также получение сорбентов на основе целлюлозы в экономическом плане, в том числе материалов, содержащих ферроцианиды, сульфиды, гидроксиды [2, 5]. Использование энтеросорбентов в ветеринарной практике способствует уменьшению токсического действия веществ, патогенных бактерий и продуктов их жизнедеятельности [3]. Вещества разнообразной химической структуры — энтеросорбенты — посредством процессов адсорбции, ионообмена, абсорбции, комплексообразования осуществляют в желудочно-кишечном тракте связывание экзогенных и эндогенных веществ.

Важное преимущество сорбентов в сравнении с другими фармакологическими препаратами заключается в опосредованности их действия, которая заключается в воздействии именно на токсин; при этом наблюдается ослабление в организме аллергических и воспалительных реакций [6].

Цель данной работы — обоснование возможности применения энтеросорбентов на основе недревесного растительного сырья в ветеринарной практике в качестве средства для лечения и профилактики желудочно-кишечных инфекций в опытах *in vivo*.

© 2022 г. Гнеушева И.А., Солохина И.Ю., Лушников А.В., Агеева Н.Ю.

\* **Автор для переписки:**

Солохина Ирина Юрьевна

канд. биол. наук, доцент кафедры биотехнологии,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»

E-mail: solohinairina@yandex.ru

## Материалы и методы

**Объекты исследования.** Для получения энтеросорбентов в качестве исходного сырья использовали измельченную (0,5 мм) воздушно-сухую массу соломы овса, гречихи посевной, ржи (влажность 10–11%).

**Получение сорбентов.** Полученное измельченное сырье экстрагировали последовательно холодной, горячей водой и смесью, состоящей из спирта и бензола, затем подвергали обработке 1%-ным раствором гидроксида натрия при следующих условиях: гидромодуль 1:25, температура 90–95 °С, в течение 1 часа при постоянном перемешивании на качалочной платформе. Полученный водный раствор щелочи по окончании процесса отделяли с помощью нутч-фильтра от реакционной смеси. Для нейтрализации остатков щелочи применяли 0,1 н. раствор соляной кислоты, дополнительно промывая сорбент водой. После удаления жидкости сорбент сушили до сухой массы при температуре 55–60 °С, затем измельчали до размера частиц 0,3–0,5 мм.

Сорбционную активность энтеросорбентов из соломы овса (Эсо), соломы гречихи (Эсг), соломы ржи (Эср) определяли, используя вещества-маркеры, которые имеют различную молекулярную массу: 0,15% — метиленовый синий — МС — и 0,60% — желатин).

Для изучения кинетики сорбции энтеросорбентами МС и желатина продолжительность контакта выдерживали в интервале от 30 до 180 минут при рН 5,5, постоянно перемешивая.

В качестве образцов сравнения использовали промышленные препараты для клинической ветеринарии «Полифепан» (ЗАО Сайтек, Санкт-Петербург) — для сельскохозяйственных животных и «Цамакс» (АО Цамакс, Россия) — для домашних животных.

Оценку эффективности лечебно-профилактического действия энтеросорбентов, содержащих солому овса, гречихи, ржи, проводили на лабораторных мышках, имеющих острые желудочно-кишечные инфекции

(формировали 10 экспериментальных групп, в каждой из которых было 5 животных) на базе Орловского государственного аграрного университета имени Н.В. Парахина. Животных заражали культурой *E. coli* серотипа O138 K99 (в 1 мл 500 млн. микробных тел), полученной после 18 часов культивирования. Культуру животным вводили внутривентриально. Энтеросорбент вводился в течение трех суток до момента заражения культурой *E. coli*. Чтобы оценить лечебные свойства сорбента, его начинали вводить при появлении первых клинических признаков заражения вплоть до полного выздоровления мышей.

Группа лабораторных мышей получала энтеросорбент для профилактики один раз в сутки из расчета 0,2 г на 1 кг массы животного. Для лечебных целей другая группа животных получала 0,2 г сорбента на 1 кг массы тела животного.

В течение всего эксперимента осуществляли оценку продолжительности проявления клинических признаков, тяжести течения заболевания, сохранность животных, определяли показатели бактериальной обсемененности культурой *E. coli*. Животные, которые погибли во время эксперимента, подвергались патологоанатомическому вскрытию.

## Результаты и обсуждение

Возможность применения энтеросорбентов в клинической практике характеризуется посредством основного показателя — сорбционной активности.

Сорбционную способность энтеросорбентов определяли с помощью метиленового синего ( $A_{МС}$ ), который способен моделировать токсичные вещества, имеющие молекулярную массу до 500 атомных единиц массы (соединения, содержащие фосфор, креатинин, барбитураты и др.), и желатина ( $A_{жел}$ ), способного моделировать белковые токсины, а также содержание в них водорастворимых веществ (ВРВ) (табл. 1).

Таблица 1

**Значение показателей основных характеристик энтеросорбентов из недревесного растительного сырья**

Показатели	Энтеросорбент				
	Эсо	Эсг	Эср	«Полифепан»	«Цамакс»
$A_{МС}$ , мг/г	53,8±1,1	55,1±1,2	54,9±2,1	54,6±0,9	53,9±1,4
$A_{жел}$ , мг/г	28,4±0,8	31,1±0,7	28,9±0,9	28,7±0,8	29,1±0,9
ВРВ, масс%	4,6±0,1	4,5±0,1	4,4±0,2	4,3±0,1	5,0±0,1
Зола, %	1,15±0,2	1,25±0,2	1,1±0,2	1,2±0,2	1,1±0,2

Установлено, что исследуемые энтеросорбенты из недревесного растительного сырья не превосходят образцы сравнения по способности сорбировать метиленовый синий и желатин.

Необходимо отметить, что энтеросорбент из соломы гречихи проявляет незначительно большую сорбционную активность в отношении желатина на 6–8%, что говорит о потенциальной способности удаления токсинов белковой структуры.

Уровень остаточных ВРВ в исследуемых энтеросорбентах находится в пределах допустимых норм (уровень, который допустим для медицинского назначения). Аналогичный вывод относится и к показателям содержания золы

— важная характеристика энтеросорбента, поскольку энтеросорбенты с малой зольностью способствуют сведению к минимуму минеральных компонентов, которые поступают в желудочно-кишечный тракт животного. В исследуемых препаратах уровень золы составляет 1,1–1,25%.

Энтеросорбенты из недревесного растительного сырья обладают достаточно быстрой сорбцией исследуемых маркерных веществ (рис. 1, 2).

Рисунки 1, 2 показывают, что, используя модельные растворы метиленового синего и желатина, достижение сорбционного равновесия наблюдали в среднем через 90 минут сорбции, которое составило 69,3–71,9 и 31,5–32,9 мг/г соответственно.

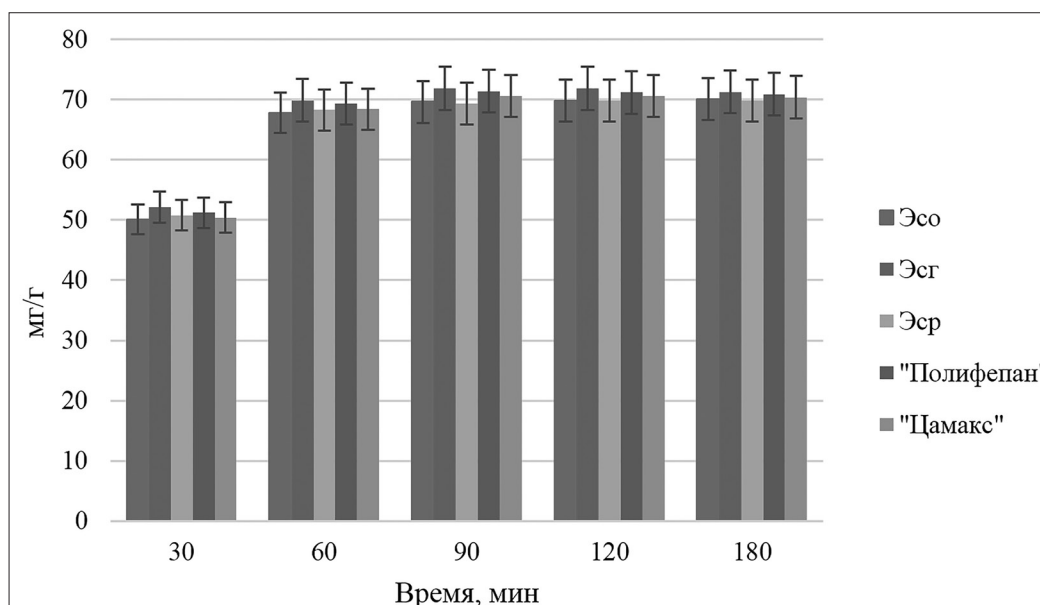


Рис. 1. Кинетические кривые сорбции метиленового синего при pH 5,5 (мг/г)

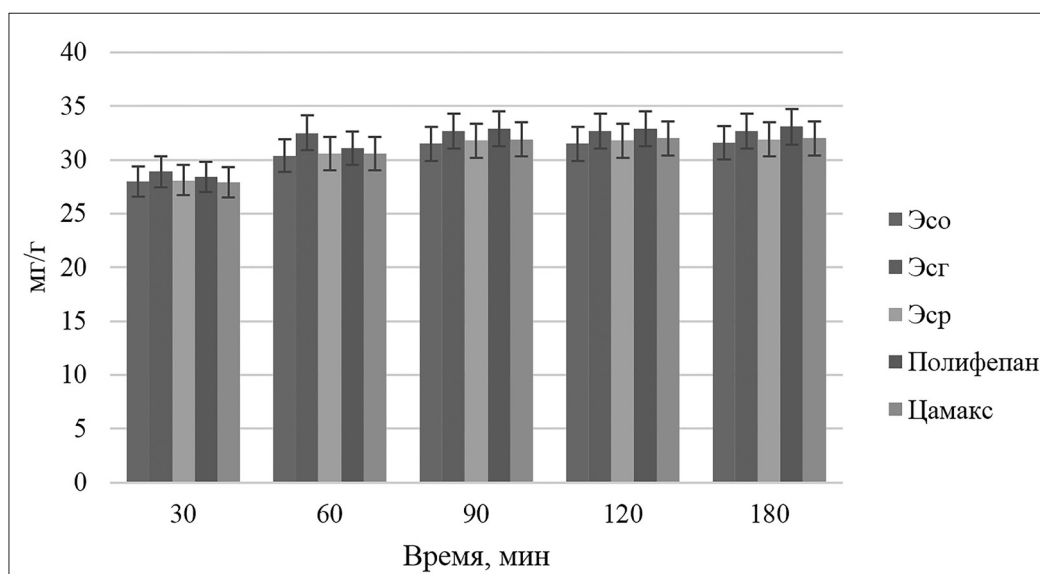


Рис. 2. Кинетические кривые сорбции желатина при pH 5,5 (мг/г)



По истечении 60 минут взаимодействия с метиленовым синим и желатином энтеросорбенты поглощают большую часть от равновесной сорбции. Данный факт говорит о способности энтеросорбентов удалять органические токсины.

Результаты изучения свойств исследуемых энтеросорбентов из растительного сырья недревесного происхождения для профилактики и лечения острых желудочно-кишечных инфекций экспериментальных животных представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Эффективность лечебного и профилактического действия энтеросорбентов (0,2 г на кг массы животного) из недревесного растительного сырья для профилактики и при остром эшерихиозе экспериментальных животных**

Группы животных	Купирование клинических признаков заболевания, ч	Показатель зараженности тестовой культурой, КОЕ/г химуса	Сохранность лабораторных мышей, %
Лечебная группа			
Опытная Эсо	Не купировано	Более 300	0
Опытная Эсг	48	12	90
Опытная Эср	48	24	60
Контрольная «Полифепан»	48	12	80
Контрольная «Цамакс»	Не купировано	Более 300	0
Профилактическая группа			
Опытная Эсо	48	18	80
Опытная Эсг	48	6	100
Опытная Эср	48	12	90
Контрольная «Полифепан»	48	6	100
Контрольная «Цамакс»	48	12	90

Изучая лечебную эффективность энтеросорбентов через 48 ч в опытных группах с экспериментальными животными, наблюдали после введения препаратов нормализацию аппетита и активность при использовании сорбентов на основе ржаной и гречишной соломы.

Экспериментальные животные были сохранены на 60–90%. В контрольной группе при лечении препаратом «Цамакс» и в опытной при введении энтеросорбента на основе соломы овса у всех животных наступила смерть от инфекции. При проведении вскрытия установили, что отсутствуют признаки воспаления, ткани печени без признаков воздействия токсинов. Это позволяет сделать вывод о незначительном влиянии токсинов бактерий на органы и ткани экспериментальных мышей.

Использование опытного энтеросорбента на основе гречишной соломы и контрольного препарата «Полифепан» в терапевтических целях привело к сохранению большей части лабораторных мышей вследствие эффективной сорбции токсинов бактерий, которая способствовала ограничению их проникновения в клетки.

У контрольной и опытной групп лабораторных мышей, зараженных эшерихиозом, применение сорбента в профилактических целях способствовало легкому течению заболевания без признаков поражения желудочно-кишечного тракта.

При проведении исследований в профилактической группе сохранность лабораторных животных с применением энтеросорбента на основе гречишной соломы достигал 100%. Аналогичный показатель сохранности наблюдался и в контрольной группе с препаратом «Полифепан». В опытной группе мышей, получавших энтеросорбент на основе ржаной соломы и в контрольной с препаратом «Цамакс», показатель сохранности животных составил 90%. Наименьший показатель сохранности лабораторных мышей наблюдали в группе при введении препарата на основе соломы овса — 80%.

Исследуя показатели зараженности тестовой культурой (КОЕ/г) химуса у экспериментального животного выявлено, что у опытной лечебной группы мышей, которая получала энтеросорбент на основе соломы гречиши,

а также препарат «Полифепан», наблюдалось снижение количества микроорганизмов *E. coli* в 25 раз, а в профилактической группе животных — в 50 раз.

Таким образом, энтеросорбент, который был получен на основе соломы гречихи и препарат «Полифепан», полученный на основе лигнина в промышленности, в данном исследовании показали высокоэффективное лечебно-профилактическое действие в отношении *E. coli* серотипа O138 K 99.

### Заключение

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что солома, являясь отходом сельскохозяйственного производства, служит сырьем для получения сорбентов, обладающих свойствами, определяющими существенные преимущества перед традиционными энтеросорбентами.

Энтеросорбент, полученный на основе соломы гречихи, при эшерихиозе обладает лечебно-профилактическим действием, что показано с помощью биологических моделей с маркерными веществами.

На перспективность применения энтеросорбентов из соломы гречихи указывают результаты экспериментов, в ходе которых получены данные, свидетельствующие о способности сорбентов удалять токсичные вещества различной природы.

Экологическая чистота, низкая себестоимость, доступная сырьевая база, высокие сорбционные характеристики позволяют рекомендовать солому гречихи для получения энтеросорбентов для использования в ветеринарии.

### Литература

1. Беляева Е.Ю., Беляева Л.Е. Применение целлюлозы в решении экологических проблем // *Химия в интересах устойчивого развития*. — 2000. — № 8. — С. 755–761.
2. Броварова О.В., Кочева Л.С., Карманов А.П., Шуктомова И.И., Рачкова Н.Г. Исследование физико-химических свойств сорбентов на основе растительного сырья // *Известия высших учебных заведений «Лесной журнал»*. — 2004. — № 4. — С. 112–121.
3. Вениг С.Б., Чернова Р.К., Сержантов В.Г. и др. Антибактериальные композиты на основе природного сорбента // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. — 2018. — Т. 59. — № 3. — С. 223–229.
4. Кузнецова С.А., Мороз А.А., Скворцова Г.П. и др.. Синтез и свойства энтеросорбента из луба коры березы с нанесенным бетулином // *Химия в интересах устойчивого развития*. — 2020. — Т. 28. — № 1. — С. 35–41.

5. Лихолобов В.А., Пьянова Л.Г., Бакланова О.Н., Седанова А.В. Модифицированные материалы на основе нанодисперсного углерода // *Химия твердого топлива*. — 2014. — № 6. — С. 57–66. doi: 10.7868/S0023117714060024.
6. Мигина Е.И. Применение энтеросорбентов в ветеринарии // *Молодой ученый*. — 2016. — №. 21(125). — С. 291–295.
7. Патент 2059425 РФ. Способ получения биосорбентов ионов радиоактивных и тяжелых металлов. Когтев Л.С. и др. Бюл. изобрет. 1996. № 16.
8. Патент 2062647 РФ. Способ получения сорбентов радионуклеотидов и тяжелых металлов. Величко Б.А., Шутова Л.А., Рыжакова А.А. и др. Бюл. изобрет. 1997. № 14.
9. Чистяков А.В., Цодиков М.В. Методы синтеза углеродных сорбентов из лигнина (обзор) // *Журнал прикладной химии*. — 2018. — Т. 91. — № 7. — С. 949–967.
10. Sokolov M.N., Kuzminova A.M., Kanatbaev S.G. Enterosorption as a method of detoxification therapy in animal and birds // *Modern Science*. — 2017. — No. 2. — С. 57–59.

### References

1. Belyayeva YeYu, Belyayeva LYe. Primeneniye tsellyulozy v reshenii ekologicheskikh problem. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya* 2000; 8:755–761 (in Russian).
2. Brovarova OV, Kocheva LS, Karmanov AP, Shuktomova II, Rachkova NG. Issledovaniye fiziko-khimicheskikh svoystv sorbentov na osnove rastitel'nogo syr'ya. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy «Lesnoy zhurnal»* 2004; 4:112–121 (in Russian).
3. Venig SB, Chernova RK, Serzhantov VG et al. Antibacterial composites based on a natural sorbent. *Moscow University Chemistry Bulletin. Ser 2. Khimiya*. 2018; 59(3):223–229. (in Russian).
4. Kuznetsova SA, Moroz AA, Skvortsova GP, Schislenko SA, Shakhtshneider TP, Chesnokov NV, Kuznetsov BN. Synthesis and properties of enterosorbent from the birch inner bark with supported botulin. *Chemistry for Sustainable Development* 2020; 28(1):35–41 (in Russian).
5. Likholobov VA, P'yanova LG, Baklanova ON et al. Modified materials based on nanodispersed carbon // *Khimiya tverdogo topliva* 2014; 6:57–66 (in Russian).
6. Migina Ye.I. Primeneniye enterosorbentov v veterinarii. *Molodoy uchenyy* 2016; 21(125):291–295 (in Russian).
7. Patent 2059425 RF. Sposob polucheniya biosorbentov ionov radioaktivnykh i tyazhelykh metallov. Kogtev LS i dr. Byul izobret. 1996. № 16 (in Russian).
8. Patent 2062647 RF. Sposob polucheniya sorbentov radionukleotidov i tyazhelykh metallov. Velichko BA, Shutova LA, Ryzhakova AA i dr. Byul izobret. 1997. № 14 (in Russian).

9. Chistyakov AV, Tsodikov MV. Metody sinteza uglerodnykh sorbentov iz lignina (obzor). Zhurnal prikladnoy khimii 2018; 91(7):949–967 (in Russian).
10. Sokolov MN, Kuzminova AM, Kanatbaev SG. Enterosorption as a method of detoxification therapy in animal and birds. Modern Science 2017; 2:57–59 (in Russian).

## JUSTIFICATION OF THE USE OF ENTEROSORBENTS BASED ON NON-WOODY PLANT RAW MATERIALS IN VETERINARY PRACTICE

I.A. GNEUSHEVA, I.Yu. SOLOKHINA, A.V. LUSHNIKOV, N.Yu. AGEEVA

*Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhina, Orel*

The article presents studies on the use of enterosorbents based on non-wood plant materials from oat, buckwheat and rye straw. A high sorption capacity of enterosorbents based on buckwheat straw in contact with marker model solutions of methylene blue and gelatin has been established. The effectiveness of the therapeutic and prophylactic action of enterosorbents was studied on laboratory white mice infected with acute escherichiosis. It is shown that the use of an enterosorbent based on buckwheat straw indicates the potential possibility of removing toxins of various nature.

*Keywords:* enterosorbents, straw, oats, rye, barley, *E. coli*, escherichiosis, sorption activity.

### **Address:**

Solokhina I. Yu., Ph.D.

Associate professor, Department of biotechnology,

Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhina, Orel

E-mail: solohinairina@yandex.ru

### **Для цитирования:**

Гнеушева И.А., Солохина И.Ю., Лушников А.В., Агеева Н.Ю. Обоснование применения энтеросорбентов на основе недревесного растительного сырья в ветеринарной практике. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):14–19.

### **For citation:**

Gneusheva I.A., Solokhina I.Yu., Lushnikov A.V., Ageeva N.Yu. Justification of the use of enterosorbents based on non-woody plant raw materials in veterinary practice. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):14–19 (in Russian).

## ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ СПОРОВЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS PUMILUS* B-13250 И *BACILLUS TOYONENSIS* B-13249

И.Ю. ЕВДОКИМОВ\*, А.Н. ИРКИТОВА, А.В. МАЛКОВА, М.В. ШИРМАНОВ, Д.Е. ДУДНИК

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул

В данной работе оценена эффективность совместного и отдельного культивирования *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249. В ходе культивирования *B. toyonensis* и *B. pumilus* в ферментере установлено, что спорообразование и при отдельном, и при совместном способах культивирования начинается через 4–8 часов с момента внесения инокулята в ферментер. Масса готовых концентратов в обоих случаях составила  $120,29 \pm 17,07$  г. Отмечено, что при сокультивировании оба штамма достигают до необходимого производственного титра (не менее  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/г в сухом концентрате). Описана возможность совместного культивирования *B. pumilus* и *B. toyonensis*, что уменьшает время и трудозатраты при производстве биологического препарата. Также выявлен синергический эффект и большая стабильность при хранении готового продукта.

**Ключевые слова:** *Bacillus pumilus*, *Bacillus toyonensis*, совместное культивирование, пробиотики, аквакультура.

### Введение

Важным приоритетом в развитии современных биотехнологий является оптимизация условий культивирования уже хорошо известных микроорганизмов, используемых в промышленном производстве, а также расширение пула используемых штаммов микробов. В опубликованной литературе много исследований, посвященных описанию исходных микроорганизмов, подбору условий культивирования, способам обогащения сред для получения целевых продуктов: биомассы, метаболитов, ферментов и т.д. При этом главными задачами при промышленном производстве бактериальных препаратов по-прежнему являются ускорение процесса ферментации с экономической точки зрения, а также наибольший выход целевого продукта [5, 9, 11, 12]. Большинство современных исследований — это работы по оптимизации условий культивирования за счет их изменения для наиболее благоприятного роста организмов. Подбор pH, уровня растворенного кислорода, температуры, применение световой индукции и т.д. направлены на наибольшее накопление биомассы микроорганизма за

более короткий промежуток времени, что значительно уменьшает финансовые затраты при производстве биопродуктов [7, 8, 20, 22].

Постоянно увеличивается категория исследований по оптимизации именно питательных сред, подбора компонентов, их количества, более дешевых альтернатив для культивирования микроорганизмов с целью удешевления производства без потери эффективности и качества, так как положительный эффект от подобных исследований экономически выгоден при промышленном производстве биологических препаратов [1, 13, 15]. В исследованиях по улучшению технологий культивирования споровых бактерий для получения целевых активных метаболитов: ферментов, аминокислот, витаминов и т.д. ученые пытаются улучшить питательные среды путем добавления специализированных компонентов, либо посадки организмов на субстраты, или же изменением состава стандартных сред [4, 15, 16, 18, 21].

Еще одним способом увеличения экономической выгоды микробного производства служит совместное культивирование разных бактерий [10, 14]. Новой и наиболее актуальной темой по использованию совместного культивирования микроорганизмов является наработка более эффективных вторичных метаболитов путем сокультивирования [17, 19].

Цель данной работы: оптимизация технологии производства пробиотика для аквакультуры и животных путем совместного культивирования *B. pumilus* B-13250 и *B. toyonensis* B-13249.

© 2022 г. Евдокимов И.Ю., Иркутова А.Н., Малкова А.В., Ширманов М.В., Дудник Д.Е.

\* Автор для переписки:

Евдокимов Иван Юрьевич

исполняющий обязанности замдиректора, младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета  
E-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

## Материалы и методы

В качестве объектов исследования использованы два штамма ризосферных споровых бактерий *B. toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 из коллекции ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета (рис. 1).

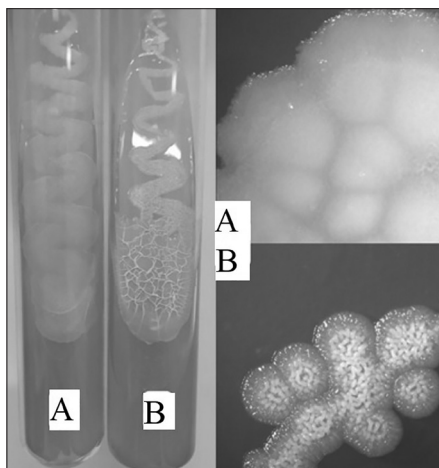


Рис. 1. Внешний вид штаммов микроорганизмов: А — чистые культуры *B. toyonensis* на скошенном агаре (слева), на L-агаре (справа), 10×; В — чистые культуры *B. pumilus* на скошенном агаре (слева), на L-агаре (справа), 10×

Как для отдельного, так и для совместного культивирования исследуемых штаммов споровых бактерий использовали одинаковые питательные среды и условия культивирования.

**Питательные среды:** L-среда для приготовления на ней посевного материала; среда Эндо для проверки наличия в пробах бактерий группы кишечной палочки; ферментативная питательная среда непосредственно для культивирования микроорганизмов в ферментере; желатиновая криопротекторная среда для защиты микроорганизмов при заморозке [3, 6].

Доля посевного материала составляла около 10% от объема стерильной питательной среды инокулируемого ферментера. Для приготовления посевного материала штаммы глубоко засевали петлей в колбы объемом 500 мл с помещенной в них питательной средой, объемом 150 мл. На этапе получения материнской культуры штаммы выращивали всегда отдельно. Культивирование велось в шейкер-инкубаторе «Innova 44» при температуре 37 °С в течение 24 часов, скорость — 250 оборотов в минуту (эксцентриситет держателя 5 см). Численность микроорганизмов, а также проверку чистоты процессов ферментаций и сухих концентратов осуществляли при

помощи поверхностного посева на среды и дальнейшего инкубирования в термостате «Binder BD 115» при 37 °С в течение 24 часов [3].

Глубинное культивирование каждого штамма, а затем и совместное, проводили в ферментере объемом 15 литров (производства ООО «Сторге», г. Санкт-Петербург) с рабочим объемом 10 л. Для сокультивирования использовали посевной материал *B. toyonensis* и *B. pumilus* объемом 1 л в соотношении 50:50 каждого штамма. Для отдельного культивирования использовали посевной материал объемом 1 л для каждого из штаммов. Для статирования необходимого рН использовали 10%-ный р-р NaOH. В качестве пеногасителя использовался лапрол. После посева температуру культуральной жидкости поддерживали на уровне 37±1 °С. В самом начале процесса в ферментер непрерывно подавали стерильный воздух в количестве 0,5 л/мин на 1 л среды и поддерживали давление 0,02—0,03 МПа, перемешивали со скоростью 250 об/мин. Каждые 2 часа проводился стерильный отбор проб для осуществления наблюдений за развитием бактериальной культуры, морфологическим состоянием и отсутствием посторонней микрофлоры, а также измерения оптической плотности (ОП<sub>490</sub>) культуральной жидкости. Время культивирования составляло 22—24 часов. Процесс завершали, опираясь на такие показатели, как процент спорообразования, количество растворенного кислорода, рН, оптическая плотность среды.

Целевым продуктом ферментации являлась биомасса микроорганизмов, поэтому проводилось концентрирование на напольной центрифуге SIGMA 4-16S/KS в течение 20 минут при 4100 об/мин. Затем биомассу смешивали с криопротекторной средой, замораживали и отправляли в камеру лиофильной сушки Epsilon 1-4 LSCplus. Время сушки составляло 39 ч и 50 мин, после чего биомассу извлекали, измельчали и проверяли на содержание влаги с помощью анализатора влажности MOC63u Shimadzu.

Полученные результаты выражали через среднее значение (M) со стандартным отклонением (m).

## Результаты

Согласно полученным нами ранее данным [2], L-среда является оптимальной для подрачивания посевного материала в колбах с целью последующего внесения в ферментационный аппарат. Показатели посевного материала, полученные в рамках данного исследования, приведены в таблице 1.

Таблица 1  
**Параметры посевного материала перед внесением в аппарат на L-среде ( $M \pm m$ )**

Штамм	Титр, КОЕ/мл	ОП	рН
<i>B. toyonensis</i> В-13249	$(2,24 \pm 0,33) \times 10^8$	$0,45 \pm 0,02$	$6,89 \pm 0,32$
<i>B. pumilus</i> В-13250	$(1,84 \pm 0,55) \times 10^9$	$0,40 \pm 0,08$	$6,87 \pm 0,68$

В начале ферментации в обоих случаях наблюдалось увеличение количества клеток микроорганизмов, при этом размер бацилл уменьшался, шло активное потребление питательных веществ из среды — о чем свидетельствуют снижение рН и количество растворенного кислорода. Через 6–8 часов культивирования уровень

рН начинал расти, происходило выделение ферментов и других продуктов жизнедеятельности бактерий в среду. Также в этот период наблюдалось активное пенообразование. После того как все питательные вещества среды были использованы микроорганизмами, происходило повышение уровня рН (8,0–9,0). При достижении рН 8,0–8,5 начиналось активное спорообразование, что подтверждалось результатами микроскопии. Во время спорообразования бациллы активно дышали, поэтому в данный период интенсивная аэрация не прекращалась, вплоть до полного прекращения цикла (24 ч).

В таблице 2 представлены показатели ферментаций штаммов *B. pumilus* и *B. toyonensis* на ферментативной питательной среде при отдельном и совместном культивировании.

Таблица 2  
**Показатели культивирования в 15 л ферментере на ферментативной среде ( $M \pm m$ )**

Штамм	ОП по часам роста				рН по часам роста			
	2	4	6	24	2	4	6	24
<i>B. toyonensis</i> В-13249	$0,98 \pm 0,30$	$1,56 \pm 0,18$	$1,53 \pm 0,06$	$2,04 \pm 0,13$	$6,97 \pm 0,26$	$8,29 \pm 0,08$	$8,61 \pm 0,06$	$8,79 \pm 0,97$
<i>B. pumilus</i> В-13250	$0,76 \pm 0,34$	$1,46 \pm 0,65$	$1,67 \pm 0,31$	$2,18 \pm 0,23$	$6,90 \pm 0,07$	$7,45 \pm 0,11$	$7,63 \pm 0,30$	$8,07 \pm 0,16$
<i>B. toyonensis</i> В-13249 + <i>B. pumilus</i> В-13250	$0,78 \pm 0,07$	$1,20 \pm 0,18$	$1,64 \pm 0,07$	$1,80 \pm 0,29$	$7,09 \pm 0,02$	$7,54 \pm 0,33$	$7,73 \pm 0,04$	$8,67 \pm 0,04$

культура *B. toyonensis* в процессе индивидуального роста сильнее смещает рН среды от первоначального значения, чем *B. pumilus*. После 4 часов культивирования, вплоть до окончания процесса (24 ч) среднее значение рН составляло  $8,29 \pm 0,08$  –  $8,79 \pm 0,97$  у *B. toyonensis* и  $7,45 \pm 0,11$  –  $8,07 \pm 0,16$  – у *B. pumilus*, соответственно. При совместном культивировании исследуемых штаммов значение рН биомассы принципиально

не отличается: через 4 ч культивирования –  $7,54 \pm 0,33$ , через 24 ч культивирования –  $8,67 \pm 0,04$ . При этом в обоих случаях к 20–24 часам культивирования и у *B. toyonensis*, и у *B. pumilus* заканчивается процесс спорообразования и вегетативных клеток фактически не остается, обе культуры переходят в споры. На рисунке 2 представлена морфология клеток бацилл в ходе совместного культивирования штаммов в биореакторе.

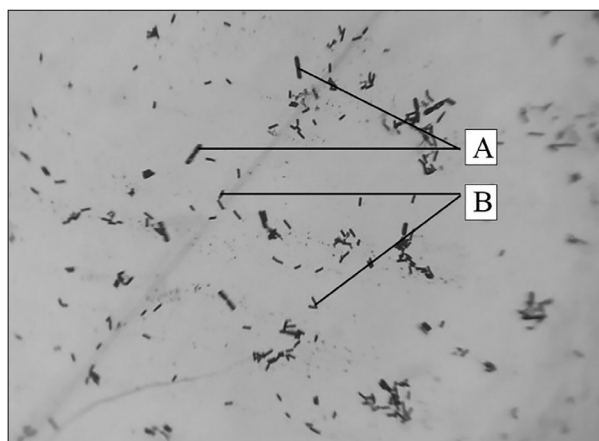


Рис. 2. Морфология клеток бацилл в пробе через 6 часов совместного культивирования, 1000×:  
 А — штамм *B. toyonensis*; В — штамм *B. pumilus*

По микроскопии визуально заметна разница в морфологии бактериальных клеток: длина и диаметр палочек *B. toyonensis* больше, чем *B. pumilus*.

Параметры центрифугирования в обоих вариантах (раздельном и совместном способе культивирования) не различались: 20 минут при 4100 об/мин. При этом оба штамма легко отделялись, не слипались и соответствовали своим первоначальным морфологическим и физиологическим характеристикам.

Условия и время процесса лиофилизации также были одинаковыми. Условия сушки: охлаждение полки и замораживание продукта до  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , прогрев до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  и сушка с увеличением на каждые  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$  градусов с шагом в 5 часов, до  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , при постоянном вакууме в 220 мбар. Время сушки: 39 ч 50 мин. Оба штамма легко перенесли сушку и их общий титр составлял  $(4,36\pm 1,42)\times 10^{11}$  КОЕ/г в сухом концентрате (табл. 3).

Таблица 3

### Изменение численности бактерий после процесса глубинного культивирования в 15 л ферментере ( $M\pm m$ )

Штамм	Титр с ферментера, КОЕ/мл	Титр высушенного концентрата, КОЕ/г	Масса концентрата, г
<i>B. toyonensis</i> В-13249	$(1,21\pm 0,30)\times 10^9$	$(3,0\pm 1,0)\times 10^{11}$	$(90,95\pm 9,47)$
<i>B. pumilus</i> В-13250	$(3,83\pm 0,29)\times 10^{11}$	$(2,66\pm 0,24)\times 10^{11}$	$(151,28\pm 12,06)$
В консорциуме: <i>B. toyonensis</i> В-13249	$(3,95\pm 1,48)\times 10^{10}$	$(4,36\pm 1,42)\times 10^{11}$	$(118,65\pm 29,13)$
В консорциуме: <i>B. pumilus</i> В-13250	$(3,10\pm 1,56)\times 10^{10}$		
Общий: <i>B. toyonensis</i> В-13249+ <i>B. pumilus</i> В-13250	$(6,71\pm 0,80)\times 10^{10}$		

В соответствии с полученными данными, масса концентратов как при раздельном культивировании, так и при совместном (суммарно) составила  $120,29\pm 17,07$  г.

На ферментативной питательной среде исследованные штаммы достигают до высокой численности как при раздельном (*B. toyonensis* В-13249 –  $(1,21\pm 0,30)\times 10^9$ ; *B. pumilus* В-13250 –  $(3,83\pm 0,29)\times 10^{11}$ ), так и совместном культивировании (*B. toyonensis* В-13249 –  $(3,95\pm 1,48)\times 10^{10}$ ; *B. pumilus* В-13250 –  $(6,71\pm 0,80)\times 10^{10}$ ). Титр, по окончании ферментации, не опускается при каждом типе культивирования ниже  $1\times 10^9$  КОЕ/мл. После окончания процесса сушки численность бактерий возрастает еще на 1–2 порядка (*B. toyonensis* В-13249 при монокультивировании титр КОЕ/мл в ферментере  $(1,21\pm 0,30)\times 10^9$ , после сушки –  $(3,0\pm 1,0)\times 10^{11}$  КОЕ/г; при сокультивировании  $(3,95\pm 1,48)\times 10^{10}$  КОЕ/мл с ферментера, после сушки  $(3,6\pm 0,94)\times 10^{11}$  КОЕ/г. Аналогично *B. pumilus* В-13250: при монокультивировании титр КОЕ/мл в ферментере ненамного разнится в сторону повышения с высушенным концентратом в пределах одного порядка, но при сокультивировании в ферментере достигал до  $(3,10\pm 1,56)\times 10^{10}$  КОЕ/мл, после сушки же КОЕ/г –  $(4,2\pm 0,11)\times 10^{11}$ .

На рисунке 3 изображены морфологически различимые колонии штаммов, посев осуществлен из вы-

сушенного концентрата, полученного после проведения цикла сокультивирования. Отчётливо видны различия в морфологическом строении выращенных колоний: *B. pumilus* образует округлые колонии, ровной формы, белого цвета, приподнятые, матовые, со складчатой каймой; *B. toyonensis* – колонии мутно-белого цвета, с блеском, приподнятые, с неровным краем.

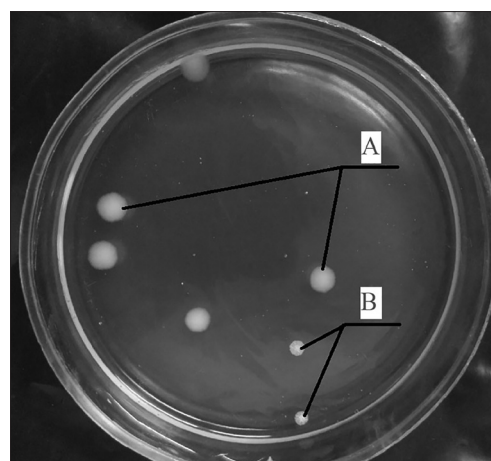


Рис. 3. Морфология колоний бактерий из концентрата, полученного совместным культивированием: А – колонии *B. toyonensis*; В – колонии *B. pumilus*

Количество каждого штамма *Bacillus* spp. в консорциуме составило не менее  $2\times 10^{10}$  КОЕ/г, минималь-

ный титр по окончании ферментации при взятии пробы из аппарата составлял  $6,04 \times 10^{10}$  КОЕ/мл, минимальный же титр готового лиофилизированного концентрата —  $3,48 \times 10^{11}$  КОЕ/г (табл. 3). Таким образом, итоговая численность *V. pumilus* в ходе раздельного и совместного культивирования как в пробах с послеферментационной среды, так и после сушки остается постоянно высокой и не опускается ниже  $1,54 \times 10^{10}$ . Численность же *V. toyonensis* в пробах из ферментера, при совместном культивировании была на порядок выше — с  $(1,21 \pm 0,30) \times 10^9$  до  $(3,95 \pm 1,48) \times 10^{10}$ , что косвенно также может свидетельствовать о синергическом эффекте штаммов и об увеличении степени сохранности смешанных концентратов разных бацилл.

### Обсуждение

Изучение динамики роста при совместном культивировании обоих штаммов микроорганизмов привело к постановке нескольких задач: создание пробиотического продукта, синергизм входящих в него организмов, установление реальных сроков хранения и сохранение свойств готового продукта, а также экономическая выгода при укорочении сроков производства и уменьшении затрат [10]. Консорциум используемых промышленных штаммов, оказывающих взаимное действие друг на друга на этапах культивирования и изготовления препарата в каждом индивидуальном препарате мало изучен, либо не изучен совсем, хотя задача подобного плана должна быть одной из приоритетных при создании биопрепаратов. Таким образом, исходя из полученных данных, одним из вариантов производства нового пробиотика для аквакультуры, а также схожих микробиологических биопродуктов является совместное культивирование штаммов.

Полученные результаты доказывают возможность совместного культивирования таких разных видов, как *V. pumilus* и *V. toyonensis*, а также свидетельствует о синергическом эффекте и большей стабильности при хранении смешанного концентрата или готового продукта. Исходя из исследований, проводимых нами ранее, по изучению сроков хранения, показано, что карантинная партия готового продукта сохраняла исходный заявленный титр в течение 12 месяцев с соблюдением условий хранения [6]. Полученные в настоящей работе данные доказывают, что подобранные микроорганизмы консорциума, даже в активной стадии жизни (при культивировании), не оказывают негативного влияния друг на друга. Соответственно, хранение сухого продукта с высушенными спорными организмами более стабильно, и срок потре-

бления данного продукта может быть увеличен. И даже в случае несоблюдения условий хранения (температура, влажность), данный пробиотик останется эффективным еще достаточно продолжительный промежуток времени.

Использование данного метода оптимизации культивирования позволяет решить сложную биотехнологическую задачу получения многокомпонентных пробиотических препаратов путем укорочения времени на производство партий продуктов, что в свою очередь повышает экономическую эффективность производства. При необходимости точного, определенного состава и соотношения частей концентратов микробов, либо пропорции, требуется стандартное раздельное культивирование. Имея готовые концентраты каждого из штаммов, возможно более корректно осуществлять смешивание и соблюдение доли каждого компонента.

### Заключение

На основании проделанного исследования можно сделать такие выводы:

1. Доказана возможность совместного глубинного культивирования *V. pumilus* В-13250 и *V. toyonensis* В-13249 с использованием режима, применяемого для раздельного культивирования.
2. Показана вероятность синергического эффекта и стабильность при хранении смешанного концентрата и готового продукта.
3. Выявлено, что при совместном культивировании оба штамма микроорганизмов дорастают до необходимого для производства титра ( $1 \times 10^{11}$  КОЕ/г в сухом концентрате).

### Литература

1. Борисовец Д.С., Журавлева Е.С., Зуйкевич Т.А., Красочко П.А., Яромчик Я.П., Морозов А.М., Курбат И.А. Оптимизация состава среды для культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. — 2020. — № 2. — С. 3–12.
2. Гребенщикова А.В. Подбор условий культивирования для бактерий рода *Bacillus* // Труды молодых ученых Алтайского государственного университета. — 2020. — № 17. — С. 3–5.
3. Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В., Яценко Е.С., Сперанская Н.Ю., Мацюра А.В. Морфологическое разнообразие *Bacillus subtilis* // Ukrainian Journal of Ecology, 2018. — Vol. 8. — Is. 2. — P. 365–370. doi: 10.15421/2018\_355.



4. Калмыкова Г.В., Чешикова А.Ф., Акулова Н.И. Повышение бактериоциноподобной активности штамма *Bacillus thuringiensis* путем улучшения состава питательной среды // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. — 2020. — Т. 50. — № 2. — С. 47–56.
5. Максимова Ю.Г., Гарина А.А., Васильев Д.М., Максимов А.Ю. Оптимизация среды культивирования амидазосодержащих бактерий // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. — 2017. — № 2. — С. 193–199.
6. Малкова А.В., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Иркутова А.Н., Дудник Д.Е. Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* В-13249 и *Bacillus pumilus* В-13250 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. — 2021. — Т. 11. — № 3(38). — С. 393–402.
7. Мальцевская Н.В. Изучение интенсивности тепловыделения светодиодных источников света при культивировании светозависимых микроорганизмов // Известия МГТУ МАМИ. — 2012. — Т. 4. — № 2(14). — С. 39–42.
8. Нагызбеккызы Э., Молдагулова Н.Б., Сембаева Д.Ж., Сембаев К.Д., Молдагулова Э.Б., Дуамбеков М.С. Подбор оптимальных параметров культивирования штаммов молочнокислых бактерий, перспективных в качестве стартерных культур при разработке закваски прямого внесения // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2019. — № 7. — С. 14–18.
9. Пискаева А.И., Просеков А.Ю. Оптимизация параметров культивирования консорциума микроорганизмов-деструкторов кератина в биотехнологических целях // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. — 2016. — Т. 16. — С. 53–61.
10. Рябая Н.Е., Головнева Н.А., Самарцев А.А., Грель М.В. Особенности роста пробиотических культур в составе поливидового консорциума / Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: тез. докл. IX Междунар. науч. конф. (Минск, 7–11 сент. 2015 г.). — Минск: Беларуская навука, 2015. — С. 46–47.
11. Самсонова А.С. Оптимизация условий глубинного культивирования микроорганизмов — деструкторов жировых веществ // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. — 2014. — № 4. — С. 63–66.
12. Фирсова М.С., Евграфова В.А., Потехин А.В. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragallinarum* // Ветеринария сегодня. — 2019. — № 2(29). — С. 12–16.
13. Anakwenze V.N., Ezemba C.C., Ekwealor I.A. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus thuringiensis* EC1 for enhanced methionine production // Advances in Microbiology. — 2014. — Vol. 4. — P. 344–352.
14. Das P., Ji B., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F., Nielsen J. In vitro co-cultures of human gut bacterial species as predicted from co-occurrence network analysis // PLoS One. — 2018. — Vol. 13(3). — e0195161. doi: 10.1371/journal.pone.0195161.
15. Hoa N.Th., Chinh T.Th., Anh D.Th.M., Binh N.D., Thanh L.Th.M. Optimization of fermentation medium compositions from dewatered wastewater sludge of beer manufactory for *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin production // American Journal of Agriculture and Forestry 2014; — Vol. 2(5). — P. 219–225.
16. Klausmann P., Hennemann K., Hoffmann M., Treinen C., Aschern M., Lilge L., Morabbi Heravi K., Henkel M., Hausmann R. *Bacillus subtilis* high cell density fermentation using a sporulation-deficient strain for the production of surfactin // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2021. — Vol. 105(10). — P. 4141–4151.
17. Li T., Tang J., Karupiah V., Li Y., Xu N., Chen J. Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites // Biol. Control. — 2019; — Vol. 140. — Art. 104122. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104122.
18. Nguyen H-Y.Th. and Tran G.-B. Optimization of fermentation conditions and media for production of glucose isomerase from *Bacillus megaterium* using response surface methodology // Scientifica (Cairo). — 2018. — Art. 6842843. doi: 10.1155/2018/6842843.
19. Sun Y., Shi X., Xing Y., Ren X., Zhang D.-Y., Li X., Xiu Z.-L., Dong. Co-culture of *Aspergillus sydowii* and *Bacillus subtilis* induces the production of antibacterial metabolites // Fungal Biology. — 2022. — Vol. 126(4). — P. 320–332. doi: 10.1016/j.funbio.2022.01.002.
20. Tian Y., Fan Y., Zhao X., Zhang J., Yang L., Liu J. Optimization of fermentation medium for acetoin production by *Bacillus subtilis* SF4-3 using statistical methods // Preparative Biochemistry and Biotechnology. — 2014. — Vol. 44(5). — P. 529–543.
21. Wu R., Chen G., Pan Sh., Zeng J. & Liang Zh. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose // Scientific Reports. — 2019. — Vol. 9(1). — Art. 6824. doi: 10.1038/s41598-019-43371-8.
22. Ye M., Sun L., Yang R., Wang Z., Qi K. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed // R. Soc. open sci. — 2017. — Vol. 4(10). — Art. 171012. doi: 10.1098/rsos.171012.

## References

1. Borisovets DS, Zhuravleva YeS, Zuykevich TA, Krasochko PA, Yarovchik YaP, Morozov AM, Kurbat IA. Optimizatsiya sostava sredy dlya kul'tivirovaniya shtammov bakteriy roda *Bacillus*, vydelennykh iz donnykh otlozheniy presnovodnykh

- vodoyemov. Epizootologiya, immunobiologiya, farmakologiya i sanitariya 2020; 2:3–12 (in Russian).
2. Grebenshchikova AV. Podbor usloviy kul'tivirovaniya dlya bakteriy roda *Bacillus*. Trudy molodykh uchenykh Altayskogo gosudarstvennogo universiteta 2020; 17:3–5 (in Russian).
  3. Irkitova AN, Grebenshchikova AV, Yatsenko YeS, Speranskaya NYu, Matsyura AV. Morfologicheskoye raznoobraziye *Bacillus subtilis*. Ukrainian Journal of Ecology 2018; 8(2):365–370. doi: 10.15421/2018\_355 (in Russian).
  4. Kalmykova GV, Cheshkova AF, Akulova NI. Povysheniye bakteriotsinopodobnoy aktivnosti shtamma *Bacillus thuringiensis* putem uluchsheniya sostava pitatel'noy sredy. Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki 2020; 50(2):47–56 (in Russian).
  5. Maksimova YuG, Garina AA, Vasil'yev DM, Maksimov AYu. Optimizatsiya sredy kul'tivirovaniya amidazosoderzhashchikh bakteriy. Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya 2017; 2:193–199 (in Russian).
  6. Malkova AV, Yevdokimov IYU, Shirmanov MV, Irkitova AN, Dudnik DYe. Razrabotka probiotika dlya zhivotnykh i akvakul'tury na osnove shtammov *Bacillus toyonensis* V-13249 i *Bacillus pumilus* V-13250. Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya 2021; 11(3):393–402 (in Russian).
  7. Mal'tsevskaaya NV. Izucheniye intensivnosti teplovydeleniya svetodiodnykh istochnikov sveta pri kul'tivirovanii sveto-zavisimykh mikroorganizmov. Izvestiya MGTU MAMI 2012; 4(2):39–42 (in Russian).
  8. Nagyzbekkyzy E, Moldagulova NB, Sembayeva DZH, Sembayev KD, Moldagulova EB, Duambekov MS. Podbor optimal'nykh parametrov kul'tivirovaniya shtammov molochnokislykh bakteriy, perspektivnykh v kachestve starternykh kul'tur pri razrabotke zakvaski pryamogo vneseniya. Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy 2019; 7:14–18 (in Russian).
  9. Piskayeva AI, Prosekov AYu. Optimizatsiya parametrov kul'tivirovaniya konsortsiuma mikroorganizmov-destruktorov keratina v biotekhnologicheskikh tselyakh. Izvestiya Irkut'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya. Ekologiya 2016; 16:53–61 (in Russian).
  10. Ryabaya NYe, Golovneva NA, Samartsev AA, Grel' MV. Osobennosti rosta probioticheskikh kul'tur v sostave polividovogo konsortsiuma. Mikrobnyye biotekhnologii: fundamental'nyye i prikladnyye aspekty: tez dokl IX Mezhdunar nauch konf (Minsk, 7–11 sent 2015). Minsk: Belaruskaya navuka, 2015: 46–47 (in Russian).
  11. Samsonova AS. Optimizatsiya usloviy glubinnogo kul'tivirovaniya mikroorganizmov – destruktorov zhirovyykh veshchestv. Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya biologicheskikh nauk 2014; 4:63–66 (in Russian).
  12. Firsova MS., Yevgrafova VA, Potekhin AV. Podbor pitatel'noy sredy i optimizatsiya rezhima glubinnogo kul'tivirovaniya *Avibacterium paragallinarum*. Veterinariya segodnya 2019; 2(29):12–16 (in Russian).
  13. Anakwenze VN, Ezemba CC, Ekwealor IA. Optimization of fermentation conditions of *Bacillus thuringiensis* EC1 for enhanced methionine production. Advances in Microbiology 2014; 4:344–352.
  14. Das P, Ji B, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F, Nielsen J. In vitro co-cultures of human gut bacterial species as predicted from co-occurrence network analysis. PLoS One 2018; 13(3):e0195161. doi: 10.1371/journal.pone.0195161.
  15. Hoa NTh, Chinh TTh, Anh DThM, Binh ND, Thanh LThM. Optimization of fermentation medium compositions from dewatered wastewater sludge of beer manufactory for *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin production. American Journal of Agriculture and Forestry 2014; 2(5):219–225.
  16. Klausmann P, Hennemann K, Hoffmann M, Treinen C, Aschern M, Lilge L, Morabbi Heravi K, Henkel M, Hausmann R. *Bacillus subtilis* high cell density fermentation using a sporulation-deficient strain for the production of surfactin. Appl. Microbiol Biotechnol 2021; 105(10):4141–4151.
  17. Li T, Tang J, Karuppiyah V, Li Y, Xu N, Chen J. Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. Biol Control 2019; 140:104122. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104122.
  18. Nguyen H-YTh and Tran G-B. Optimization of fermentation conditions and media for production of glucose isomerase from *Bacillus megaterium* using response surface methodology. Scientifica (Cairo) 2018; 6842843. doi: 10.1155/2018/6842843.
  19. Sun Y, Shi X, Xing Y, Ren X, Zhang D-Y, Li X, Xiu Z-L, Dong. Co-culture of *Aspergillus sydowii* and *Bacillus subtilis* induces the production of antibacterial metabolites. Fungal Biology 2022; 126(4):320–332. doi: 10.1016/j.funbio.2022.01.002.
  20. Tian Y, Fan Y, Zhao X, Zhang J, Yang L, Liu J. Optimization of fermentation medium for acetoin production by *Bacillus subtilis* SF4-3 using statistical methods. Preparative Biochemistry and Biotechnology 2014; 44(5):529–543.
  21. Wu R, Chen G, Pan Sh, Zeng J & Liang Zh. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose. Scientific Reports 2019; 9(1):6824. doi: 10.1038/s41598-019-43371-8.
  22. Ye M, Sun L, Yang R, Wang Z, Qi K. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed. R Soc open sci 2017; 4(10):171012. doi: 10.1098/rsos.171012.

## OPTIMIZATION OF PROBIOTIC PRODUCTION TECHNOLOGY BASED ON SPORE-FORMING BACTERIA *BACILLUS PUMILUS* B-13250 AND *BACILLUS TOYONENSIS* B-13249

I.Yu. EVDOKIMOV, A.N. IRKITOVA, A.V. MALKOVA, M.V. SHIRMANOV, D.E. DUDNIK

*Altai State University, Barnaul*

In this work, the effectiveness of joint and separate cultivation of *B. pumilus* B-13250 and *B. toyonensis* B-13249 was evaluated. During the cultivation of *B. toyonensis* and *B. pumilus* in bioreactors, it was found that spore formation in both separate and joint cultivation methods begins 4–8 hours after the inoculum introduction into the fermenter. The mass of finished concentrates in both cases was  $120.29 \pm 17.07$  g. It was noted that during co-cultivation, both strains grow to the required production titer (at least  $1 \times 10^{11}$  CFU/g in dry concentrate). The possibility of joint cultivation of *B. pumilus* and *B. toyonensis* is described. This reduces time and labor costs in the production of a biological preparation. A synergistic effect and greater stability during storage of the finished product are also revealed.

*Keywords:* *Bacillus pumilus*, *Bacillus toyonensis*, co-cultivation, probiotics, aquaculture.

### **Address:**

Evdokimov I. Yu.,  
Acting deputy director, junior researcher of the EC «Prombiotech»,  
Altai State University, Barnaul  
E-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

### **Для цитирования:**

Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н., Малкова А.В., Ширманов М.В., Дудник Д.Е. Оптимизация технологии производства пробиотика на основе спорных бактерий *Bacillus pumilus* b-13250 и *Bacillus toyonensis* b-13249. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):20–27.

### **For citation:**

Evdokimov I. Yu., Irkitova A.N., Malkova A.V., Shirmanov M.V., Dudnik D.E. Optimization of probiotic production technology based on spore-forming bacteria *Bacillus pumilus* B-13250 and *Bacillus toyonensis* B-13249. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):20–27 (in Russian).

# ИЗМЕНЕНИЕ КИШЕЧНОГО ПРОФИЛЯ МИКРОБИОТЫ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ ВНЕСЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ В РАЦИОН ЦЫПЛЯТАМ-БРОЙЛЕРАМ

С.В. СИДОРЕНКО\*, Г.Ф. РЫЖКОВА

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

В работе изучено влияние внесения в рацион цыплятам-бройлерам пробиотиков «Зоонорм» и «Ветом 4» на профиль кишечной микробиоты. Рассмотрены различные механизмы возможной взаимосвязи микроорганизмов кишечника с иммунологическими показателями. Исследован иммунитет в контексте средств эволюционировавшего многоклеточного организма, необходимых для реализации симбиотических отношений хозяина (цыплат-бройлеров) с микроорганизмами, населяющими кишечник.

**Ключевые слова:** пробиотики, микробиота, бифидобактерии, лактобактерии, колонизационная резистентность, бактерицидная активность, лизоцимная активность, иммуноглобулины, Т-, В-лимфоциты.

## Введение

Птицеводство — это наиболее динамично развивающаяся отрасль сельского хозяйства, призванная в короткие сроки обеспечить население высококачественной белковой продукцией. Отрицательной стороной внедрения интенсивных технологий выращивания служит всевозрастающая нагрузка на организм птицы, ослабление защитных систем организма. В результате промышленных условий содержания многотысячного поголовья на ограниченной территории происходит снижение естественной резистентности, возрастает стрессовая нагрузка.

Иммунная система очень чувствительна к возникновению различного рода стрессов, в силу чего она заслуживает особого внимания. Разбалансировка иммунной системы приводит к снижению естественной резистентности и возникновению различных заболеваний.

Пробиотики — это живые микроорганизмы, способные возместить недостаток собственной нормофлоры за счет конкурирования за места адгезии в кишечнике с патогенной и условно-патогенной микробиотой.

Цель данной работы — изучить комплексное влияние пробиотических препаратов «Зоонорм» и «Ветом 4»

на кишечный микробиоценоз и, кроме того, рассмотреть влияние изменений кишечного профиля микробиоты на показатели иммунного статуса птицы.

## Материалы и методы

Для реализации поставленной цели в условиях вивария ОБУ «Курская областная ветеринарная лаборатория» был поставлен опыт, в ходе которого были сформированы три группы цыплат-бройлеров кросса «Ross-308», включавшие в себя по 50 цыплат суточного возраста. Кормление цыплат групп осуществляли кормовыми смесями одного и того же состава, согласно рекомендуемым нормам кормления. В рацион цыплат первой опытной группы вносили дополнительно пробиотик «Зоонорм» с титром  $1 \times 10^7$  КОЕ *Bifidobacterium bifidum* — добавлялся в воду. В рацион второй опытной группы добавлялся пробиотик «Ветом 4», в одном грамме которого содержится  $1 \times 10^6$  КОЕ живых микробных клеток генетически модифицированного штамма спорообразующих бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-10643.

Забор крови для определения иммунологических показателей крови и естественной резистентности цыплат-бройлеров осуществляли на 14-, 28- и 42-е сутки. Содержание Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов по реакции розеткообразования определяли по И.Ю. Ездоковой, О.М. Чуйко, Е.О. Чадиной; фагоцитарную активность лейкоцитов — по методу В.М. Бермана и Е.М. Славской; иммуноглобулинов,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулинов — нефелометрическим методом; бактерицидную активность сыворотки

© 2022 г. Сидоренко С.В., Рыжкова Г.Ф.

\* **Автор для переписки:**

Сидоренко Семен Владимирович  
аспирант, ФГБОУ ВО Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И.И. Иванова, г. Курск  
E-mail: semen.sidorenko.92@mail.ru

крови — по методу Мишеля Теффера в модификации О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой; лизоцимную активность — фотоэлектроколориметрическим методом по А.Г. Дорофейчуку с изменением температурного режима реакции сыворотки крови кур с культурой *M. lysodecticus*.

Микробиологические исследования, высеив и подсчет микроорганизмов проводили на соответствующих селективных средах. Число бифидобактерий определяли на среде Блаурока, лактобацилл — на модифицированной селективной среде Рогозы, БГКП — на среде Эндо, энтерококков — на энтерококкагаре, стафилококков — на молочно-солевом агаре.

### Результаты и обсуждение

В таблице 1 приведены данные о возможном влиянии микроорганизмов, содержащихся в пробиотических препаратах, на организм хозяина. В ходе опыта

одной из задач являлось проверить эти предположения, установив влияние пробиотиков на кишечный профиль микробиоты и на иммунологические показатели цыплят-бройлеров.

В таблице 2 уже приведены фактические сведения авторов статьи. В результате анализа данных этой таблицы установлено, что на начальный период выращивания достоверных отличий в содержании тех или иных микроорганизмов в кишечнике цыплят-бройлеров всех групп не было. Однако в течение всего последующего периода осуществления эксперимента все более четко намечалась тенденция роста представителей нормальной микрофлоры кишечника цыплят опытных групп относительно контроля: лактобактерий и бифидобактерий. Содержание же представителей патогенной и условно-патогенной микробиоты: БГКП, энтерококков, стафилококков — уменьшалось относительно контрольных значений.

Таблица 1

Данные о возможном влиянии пробиотических микроорганизмов на организм хозяина

Микроорганизмы	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Данные литературы о влиянии пробиотических микроорганизмов на многоклеточный организм хозяина	Оказывают антитоксическое и иммуномодулирующее действие, обусловленное выработкой пептидогликанов, липополисахаридов, тейхоевых и липотейхоевых кислот	В кишечнике животных споры бактерий трансформируются в вегетативные формы и выделяют антибиотикоподобные субстанции, ферменты, другие биологически активные вещества, под воздействием которых нормализуются: биоценоз кишечника; кислотность среды; пищеварение; происходит стимуляция клеточных и гуморальных факторов иммунитета

Таблица 2

Количество микроорганизмов в кишечнике цыплят-бройлеров, Lg КОЕ/г

Микроорганизмы	Группа	Количество микроорганизмов в кишечнике цыплят-бройлеров, Lg КОЕ/г, возраст цыплят, дни					
		14		28		42	
			%		%		%
Лактобактерии	Контроль	3,96±0,3	20,4	7,01±0,26	25,32	8,2±0,17	23,22
	«Ветом 4»	3,99±0,24	20,42	8,34±0,16	29,08	9,2±0,13	25,45
	«Зоонорм»	3,95±0,28	20,3	7,68±0,29	27,2	9,61±0,22	26,65
Бифидобактерии	Контроль	4,4±0,16	22,67	6,04±0,22	21,81	8,92±0,25	25,25
	«Ветом 4»	4,32±0,25	22,11	9,02±0,12	31,45	9,65±0,15	26,69
	«Зоонорм»	4,23±0,1	21,74	8,36±0,27	29,6	9,82±0,23	27,23
БГКП	Контроль	5,5±0,18	28,34	2,28±0,28	8,23	7,7±0,16	21,8
	«Ветом 4»	5,7±0,17	29,17	1,59±0,28	5,54	7,5±0,18	20,75
	«Зоонорм»	5,82±0,13	29,91	1,78±0,18	6,3	7,2±0,21	19,97
Энтерококки	Контроль	4,7±0,14	24,21	5,28±0,13	19,07	7,3±0,24	20,67
	«Ветом 4»	4,8±0,14	24,56	3,58±0,27	12,48	6,8±0,14	18,81
	«Зоонорм»	4,72±0,25	24,25	4,16±0,13	14,73	6,6±0,23	18,3
Стафилококки	Контроль	0,85±0,23	4,38	7,08±0,14	25,57	3,2±0,19	9,06
	«Ветом 4»	0,73±0,16	3,74	6,15±0,2	21,44	3±0,25	8,3
	«Зоонорм»	0,74±0,29	3,8	6,26±0,26	22,17	2,83±0,25	7,85

Примечание:  $p < 0,05$

В последние годы прогресс в иммунологии характеризовался растущим пониманием фундаментальной роли микробиоты в функционировании иммунной системы многоклеточных микроорганизмов. Возникновение некоторых систем, связанных с адаптивными проявлениями иммунитета, совпало с приобретением многоклеточными организмами сложной микробиоты, что подтверждает необходимость усложнения иммуни-

тета именно как средства регуляции взаимоотношения с микроорганизмами-симбионтами. Микрофлора, в свою очередь, также влияет на иммунологическую реактивность, что подтверждается проведенными исследованиями, результаты которых приведены в таблицах 3 и 4. На протяжении всего опыта значения IgG, IgA, IgM в опытных группах были достоверно выше контрольных значений.

Таблица 3

## Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови цыплят-бройлеров, г/л

Время, сутки	14			28			42		
	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
Контроль	3,24±0,11	2,11±0,09	2,83±0,11	3,13±0,07	1,95±0,05	2,70±0,08	3,25±0,07	2,08±0,06	2,81±0,07
«Ветом 4»	3,49±0,09	2,25±0,07	3,21±0,10	3,18±0,09	2,08±0,05	2,95±0,08	3,55±0,10	2,32±0,09	2,95±0,12
«Зоонорм»	3,52±0,14	2,21±0,08	3,12±0,09	3,52±0,05	2,03±0,07	2,81±0,06	3,52±0,09	2,27±0,08	2,86±0,08

Примечание:  $p < 0,05$

Таблица 4

## Иммунологические показатели крови цыплят-бройлеров

Контроль			«Зоонорм»			«Ветом 4»		
7	28	42	7	28	42	7	28	42
Бактерицидная активность, %								
47,93±1,76	51,58±1,87	52,89±1,78	52,31±1,83	53,9±1,85	57,98±1,95	48,8±2,09	56,8±1,79	58,2±1,88
Фагоцитарная активность, %								
36,82±1,2	38,08±1,17	40,22±1,46	37,1±1,22	43,13±1,68	48,82±1,35	37,11±1,69	47,05±1,42	53,55±1,7
Лизоцимная активность, %								
16,25±1,15	18,16±1,26	20,87±1,19	17,32±1,4	18,56±1,78	22,51±1,38	16,22±1,44	21,52±1,54	30,51±1,4
Т-лимфоциты, %								
13,31±1,11	13,29±1,4	13,82±1,18	13,4±1,19	14,98±1,51	16,71±1,19	13,65±1,47	16,33±1,3	19,93±1,39
В-лимфоциты, %								
15,29±1,19	16,45±1,24	17,75±1,44	15,32±1,37	18,55±1,38	19,2±1,29	15,38±1,34	17,76±1,27	21,18±1,41

Примечание:  $p < 0,05$

Бактерицидная активность — это комплексный параметр, отражающий суммарный результат действия всех гуморальных факторов естественной резистентности, но за счет тесного взаимодействия врожденного и специфического проявлений иммунитета большое влияние на бактерицидную активность имеет и клеточный фактор иммунитета [1]. Т-лимфоциты участвуют в регуляции активности макрофагов, продуцирующих лизоцим, который усиливает бактерицидную активность выделяющихся иммуноглобулинов [2]. Таким образом, результаты анализа иммуноглобулинов, приведенные в таблице 3, согласуются с данными результатов анализа бактерицидной, лизоцимной активностей. У цыплят опытных групп эти показатели были

достоверно выше контрольных значений практически на всем протяжении проведения эксперимента, при этом оставаясь в пределах физиологической нормы. Так, на конец опыта бактерицидная активность сыворотки крови составляла 57,98% и 58,20% в группах «Зоонорм» и «Ветом 4» соответственно, что было выше контрольных значений на 5,09% и 5,31%. Лизоцимная активность превышала контрольные значения на 1,64% и на 9,64% в группах «Зоонорм» и «Ветом 4» соответственно.

Фагоцитарная активность характеризует способность иммунной системы осуществлять захват и переваривание чужеродной патогенной микробиоты. Динамика этого показателя также имела тенденцию

роста у цыплят-бройлеров опытных групп. На конец опыта фагоцитарная активность была выше аналогов контрольных групп на 8,6% в группе «Зоонорм» и на 13,33% в группе «Ветом 4».

Т- и В-лимфоциты являются ключевыми клетками адаптивного иммунного ответа, обеспечивая продуцирование воспалительных цитокинов, специфических рецепторов, связывающих антигены. Т- и В-лимфоциты — это клетки иммунной памяти, выполняющие функцию иммунного надзора, избавляя организм от всего чужеродного, сохраняя таким образом генетическое постоянство внутренней среды организма. Содержание лимфоцитов в крови цыплят бройлеров опытных групп достоверно превышало значения этого показателя у аналогов из контрольной группы, не превышая при этом значение физиологической нормы. Так, на конец опыта содержание Т-лимфоцитов было больше контрольных значений на 3,89% и В-лимфоцитов — на 1,45% в группе «Зоонорм», а в группе «Ветом 4» содержание Т-лимфоцитов превышало контроль на 6,11% и содержание В-лимфоцитов — на 3,43%. В результате анализа кишечного содержимого цыплят-бройлеров и определения иммунологических показателей наблюдается некоторая корреляция между ростом представителей полезной микрофлоры кишечника

и повышением клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа. Механизм подобной взаимосвязи может заключаться в следующем:

- пробиотики проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении патогенов, конкурируя за места адгезии в эпителии кишечника и питательные вещества, продуцируя биологически активные вещества, антимикробные вещества, ферменты, аминокислоты [18, 19];
- пробиотики подавляют рост бактерий, ответственных за образование кишечных токсинов [9];
- пробиотики оказывают стимулирующее действие на иммунитет, ингибируя аллергические и аутоагрессивные реакции, увеличивая выработку иммуноглобулинов, цитокинов, усиливая активность лимфоцитов и макрофагов, путем выработки физиологически активных субстратов, ДНК и компонентов клеточной стенки самих пробиотиков, которые распознаются специализированными клетками хозяина (цыплят-бройлеров) [12, 20]. Эти компоненты и их влияние на различные системы иммунитета, что подтверждается многими источниками, представлены в таблице 5 со ссылками на соответствующие материалы исследований.

Таблица 5

### Метаболиты пробиотиков и их влияние

Фактор	Влияние	Ссылка
Бутират	Увеличивает активность ядерного фактора каппа-цепи В-лимфоцитов NF- $\kappa$ B	[4]
Бутират	Уменьшает выработку интерлейкинов IL6, IL8, IL12, фактора некроза опухоли TNF- $\alpha$ , увеличивает интерлейкин 10, трансформирующий фактор роста TGF- $\beta$ , CD3, CD25, транскрипционный фактор развития и функционирования регуляторных Т-клеток	[3]
Молочная кислота	Усиливает фагоцитарную активность макрофагов, базофилов, нейтрофилов, эозинофилов	[15]
Пептидогликан	Активирует систему комплемента	[6]
Липо-, рибитол- и глицеролтёйхоевые кислоты	Активируют интерлейкины IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ . Способствуют пролиферации и дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки и выработке соответствующих специфических антител	[10, 14]
Тейхоевые кислоты	Увеличивают активность интерлейкинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$	[3, 5]
Фрагменты ДНК	Блокируют активацию toll-подобного рецептора	[17]

Анализируя данные литературы, можно предположить следующие пути иммуномодулирующего действия пробиотиков. Известно, что короткоцепочечные жирные кислоты, являющиеся метаболитами пробиотиков, способны стимулировать образование слизи, защищаю-

щей эндотелий кишечника от бактериальной инвазии и являющейся резервуаром для антимикробных веществ дефензинов и IgA.

Введение пробиотиков в рацион стимулирует активацию фактора транскрипции, отвечающего за контроль

экспрессии генов иммунного ответа — ядерного фактора каппа-цепи В-лимфоцитов NF- $\kappa$ B, что индуцирует синтез провоспалительных цитокинов. Кроме того, введение пробиотиков способствует усилению активности белков системы комплемента.

Интерлейкины являются медиаторами, оказывающими регуляторное воздействие на клетки иммунной системы организма; в частности, они способствуют пролиферации и дифференцировке В-лимфоцитов.

Многочисленные исследования тейхоевых кислот и липотейхоевых кислот показали, что при условии их нахождения в естественном окружении интактной клетки или ее клеточной стенке, они обладают выраженными антигенными свойствами и способны вызывать иммунный ответ [7, 8, 11, 13, 16, 21].

### Заключение

Таким образом, введение в рацион цыплятам-бройлерам пробиотиков способствует заселению кишечника представителями нормальной микрофлоры за счет их антагонизма по отношению к патогенной и условно-патогенной микробиоте. При этом происходят увеличение содержания иммуноглобулинов и рост активности иммунологических показателей крови. По-видимому, в результате активного взаимодействия микробиоты кишечника и эндотелия осуществляется передача иммунных сигналов, что способствует активации, обучению и более эффективному функционированию иммунной системы цыплят-бройлеров, то есть более эффективному распознаванию и элиминации чужеродных антигенов и активации регуляторных путей, поддерживающих толерантность к безвредным антигенам.

### Литература

1. Биоантиоксидант: Тезисы докладов IX Международной конференции. Москва, 29 сентября — 2 октября 2015 г. — М.: РУДН, 2015. — 218 с.
2. Биоантиоксидант: Тезисы докладов VIII Международной конференции. Москва, 4—6 октября 2010 г. — М.: РУДН, 2010. — 558 с.
3. Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Аладышева Ж.И., Мацулевич Т.В. Пробиотики и механизмы их лечебного действия // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2004. — № 3. — С. 83—87.
4. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. — 2003. — Т. 2. — № 4. — С. 50—57.
5. Николаева Т.Н., Зорина В.В., Бондаренко В.М. Роль цитокинов в модуляции иммунореактивности организма бактериями рода *Lactobacillus* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2004. — № 6. — С. 101—106.
6. Прокопьев А.А., Калинина Н.М., Андреев С.В. и др.. Пептидогликан, выделенный из *Lactobacillus bulgaricus*: влияние, опосредуемое через систему комплемента, на созревание пре-Т-клеток // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1987. — Т. 104. — № 10. — С. 492—494.
7. Baddiley J., Davison A.L. The occurrence and location of teichoic acids in lactobacilli // J. Gen. Microbiol. — 1961. — Vol. 24. — P. 295—299.
8. Borchers A.T., Selmi C., Meyers F.J. et al. Probiotics and immunity // J. Gastroenterol. — 2009. — Vol. 44(1). — P. 26—46.
9. Brandão R.L., Castro I.M., Bambirra E.A. et al. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. — 1998; — Vol. 64. — No. 2. — P. 564—568.
10. Choopenning F.W. Immunologic effects of teichoic acid and inanimate bacterial product in the environment: A review // Ohio J. Sci. — Vol. 82. — No. 1. — P. 31—37.
11. Clark E.E., Wesley I., Fiedler F., Promadej N., Kathariou S. Absence of serotype-specific surface antigen and altered teichoic acid glycosylation among epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes* // J. Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38(10). — P. 3856—3859.
12. Isolauri E., Sütas Y., Kankaanpää P. et al. Probiotics: effects on immunity // Am. J. Clin. Nutr. — 2001. — Vol. 73. — Suppl. 2. — P. 444S—450S.
13. Knox K.W., Wicken A.J. Bacterial cell surface amphiphiles // Microbiology. — 1977. — Vol. 3. — P. 256—359.
14. Knox K.W., Wicken A.J. Immunological properties of teichoic acids // Bacteriol. Rev. — 1973. — No. 37. — P. 215—257.
15. Miquel S., Martín R., Rossi O. et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health // Curr. Opin. Microbiol. — 2013. — Vol. 16. — No. 3. — P. 255—261.
16. Oelschlaeger T.A. Mechanisms of probiotic actions — A review // Int. J. Med. Microbiol. — 2010. — Vol. 300. — No. 1. — P. 57—62.
17. O'hara A.M., Shanahan F. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases // Scientific World Journal. — 2007. — Vol. 7. — P. 31—46.
18. Simon O., Jadamus A., Vahjen W. Probiotic feed additives — effectiveness and expected modes of action // J. Anim. Feed. Sci. — 2001. — Vol. 10. — Suppl. 1. — P. 51—67.
19. Vandenberg P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth // FEMS Microbiol. Rev. — 1993. — Vol. 12. — Issue 1—3. — P. 221—237.
20. Wicken A.J., Knox K.W. Lypoteichoic acids: A new class of bacterial antigen // Science. — 1975. — Vol. 187. — P. 1161—1167.



21. Yokoyama Y., Harabuchi Y. Decreased serum and pharyngeal antibody levels specific to streptococcal lipoteichoic acid in children with recurrent tonsillitis // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. — 2002. — Vol. 63. — P. 199–207.

## References

1. Bioantioksidant: Tezisy dokladov IX Mezhdunarodnoy konferentsii. Moskva, 29 sentyabrya — 2 oktyabrya 2015. Moscow: RUDN, 2015: 218 (in Russian).
2. Bioantioksidant: Tezisy dokladov VIII Mezhdunarodnoy konferentsii. Moskva, 4–6 oktyabrya 2010. Moscow: RUDN, 2010: 558 (in Russian).
3. Bondarenko VM, Chuprinina RP, Aladysheva ZHI, Matushevich TV. Probiotiki i mekhanizmy ikh lechebnogo deystviya. Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya 2004; 3:83–87 (in Russian).
4. Glushanova NA. Biologicheskiye svoystva laktobatsill. Byulleten' sibirskoy meditsiny 2003; 2(4):50–57 (in Russian).
5. Nikolayeva TN, Zorina VV, Bondarenko VM. Rol' tsitokinov v modulyatsii immunoreaktivnosti organizma bakteriyami roda *Lactobacillus*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2004; 6:101–106 (in Russian).
6. Prokop'yev AA, Kalinina NM, Andreyev SV [i dr]. Peptidoglikan, vydelennyy iz *Lactobacillus bulgaricus*: vliyaniye, oposreduyemoye cherez sistemu komplekta, na sozrevaniye pre-T- kletok. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny 1987; 104(10):492–494 (in Russian).
7. Baddiley J, Davison AL. The occurrence and location of teichoic acids in lactobacilli. J Gen Microbiol 1961; 24:295–299.
8. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ et al. Probiotics and immunity. J Gastroenterol 2009; 44(1):26–46.
9. Brandão RL, Castro IM, Bambirra EA et al. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii*

- and *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol 1998; 64(2):564–568.
10. Choorpenning FW. Immunologic effects of teichoic acid and inanimate bacterial product in the environment: A review. Ohio J Sci 82(1):31–37.
11. Clark EE, Wesley I, Fiedler F, Promadej N, Kathariou S. Absence of serotype-specific surface antigen and altered teichoic acid glycosylation among epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol 2000; 38(10):3856–3859.
12. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P et al. Probiotics: effects on immunity. Am J Clin Nutr 2001; 73(Suppl. 2):444S–450S.
13. Knox KW, Wicken AJ. Bacterial cell surface amphiphiles. Microbiology 1977; 3:256–359.
14. Knox KW, Wicken AJ. Immunological properties of teichoic acids. Bacteriol Rev 1973(37):215–257.
15. Miquel S, Martín R, Rossi O et al. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. Curr Opin Microbiol 2013; 16(3):255–261.
16. Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions — A review. Int J Med Microbiol 2010; 300(1):57–62.
17. O'hara AM, Shanahan F. Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. Scientific World Journal 2007; 7:31–46.
18. Simon O, Jadamus A, Vahjen W. Probiotic feed additives — effectiveness and expected modes of action. J Anim Feed Sci 2001; 10. — Suppl. 1:51–67.
19. Vandenberg PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol Rev 1993; 12(Issue 1–3):221–237.
20. Wicken AJ, Knox KW. Lypoteichoic acids: A new class of bacterial antigen. Science 1975; 187:1161–1167.
21. Yokoyama Y, Harabuchi Y. Decreased serum and pharyngeal antibody levels specific to streptococcal lipoteichoic acid in children with recurrent tonsillitis. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2002; 63:199–207.

## CHANGES IN THE INTESTINAL MICROBIOTA PROFILE AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AS A RESULT OF THE ADMINISTRATION OF PROBIOTICS IN THE DIET FOR BROILER CHICKENS

S.V. SIDORENKO, G.F. RYZHKOVA

*Kursk State Agricultural Academy named after I.I. Ivanov, Kursk*

In the work, the effect of introducing probiotics «Zoonorm» and «Vetom 4» into the diet of broiler chickens on the profile of intestinal microbiota was studied. Various mechanisms of a possible relationship between intestinal microorganisms and immunological parameters are considered. Immunity has been studied in the context of the means of an evolved multicellular organism, necessary for the implementation of the symbiotic relationship of the host (broiler chickens) with microorganisms inhabiting the intestine.

**Keywords:** probiotics, microbiota, bifidobacteria, lactobacilli, colonization resistance, bactericidal activity, lysozyme activity, immunoglobulins, T-, B-lymphocytes.

**Address:**

Sidorenko S.V.  
Postgraduate student, Kursk State Agricultural Academy  
named after I.I. Ivanova, Kursk  
E-mail: semen.sidorenko.92@mail.ru

**Для цитирования:**

Сидоренко С.В., Рыжкова Г.Ф. Изменение кишечного профиля микробиоты и иммунологических показателей в результате внесения пробиотиков в рацион цыплятам-бройлерам. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):28–34.

**For citation:**

Sidorenko S.V., Ryzhkova G.F. Changes in the intestinal microbiota profile and immunological parameters as a result of the administration of probiotics in the diet for broiler chickens. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):28–34 (in Russian).

# ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ ФУКОИДАН/МАГНЕТИТ, ЗАГРУЖЕННЫХ МОДЕЛЬНЫМ ФЕРМЕНТОМ

В.Е. СУПРУНЧУК\*

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь

В работе исследована возможность создания наночастиц на основе фукоидана, модифицированного магнетитом, применимых при разработке адресных систем доставки. Для характеристики синтезированных образцов наночастиц фукоидан/магнетит был использован метод динамического рассеяния света, сканирующая электронная микроскопия. Показана возможность формирования частиц фукоидан/магнетит с последующей загрузкой ферментного препарата. Кроме того, присутствие анионного поверхностно-активного вещества (ПАВ) имеет значительное влияние на величину поверхностной плотности заряда и размер системы фукоидан/магнетит/фермент.

*Ключевые слова:* фукоидан, магнетит, тканевой активатор плазминогена, наночастицы, биокомпозит.

## Введение

Фукоидан является биополимером, имеющим полисахаридную природу и выделяемым из бурых водорослей. Интерес к фукоидану обусловлен наличием у него ряда физиологически важных свойств, среди которых можно выделить антикоагулянтное [4], антиоксидантное [10], противомикробное [11], противоопухолевое, противовоспалительное действие [8] и др. Эти свойства в совокупности с биосовместимостью и отсутствием токсичности делают фукоидан перспективным соединением для разработки новых материалов медицинского назначения, в частности, адресных систем доставки лекарственных веществ. В данном случае при создании таких систем полисахариды могут выступать как альтернатива синтетическим полимерам, но исключая использование токсичных растворителей. Кроме того, полисахариды, как правило, имеют реакционно-способные группы, что позволяет взаимодействовать со многими соединениями с образованием устойчивых систем. Разработка систем доставки может быть основана на модификации фукоидана наночастицами металлов или их оксидов. Такой способ дает возможность создавать материал с различным способом нацеливания и высвобождения молекулярного груза, например, магнитным [6], ультразвуковым

[3], лазерным воздействием [5, 9]. Использование наночастиц магнетита  $Fe_3O_4$  при разработке адресных систем доставки может обеспечивать магнитоуправление созданным материалом, что приводит к его накоплению в заданном месте, а использование «зеленой» матрицы снижает токсичность материала. Таким образом разработка синергетической системы фукоидан/магнетит может создать несинтетическую систему адресной доставки лекарственных веществ с возможностью магнитного манипулирования.

Цель работы — формирование и изучение физико-химических свойств наночастиц фукоидан/магнетит, применимых в качестве носителя ферментного препарата.

## Материалы и методы

В работе был использован фукоидан, полученный по методике [1]. Затем готовили 0,1%-ный раствор фукоидана в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Суспензия магнетита была получена с помощью метода химического соосаждения ионов  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  [2] с электрохимическим потенциалом  $+28,54 \pm 0,72$  мВ. Приготовление наночастиц фукоидан/магнетит осуществляли путем смешивания раствора фукоидана и золя магнетита при комнатной температуре в течение 2 часов. Полученные наночастицы трижды промывали и вновь ресуспендировали. Для определения размера и дзета-потенциала частиц фукоидан/магнетит образцы переносили в прозрачные кюветы для анализа динамического светорассеяния. Измерения для каждого образца проводили в трех повторностях с помощью Photocor Compact Z (ООО «Фотокор», Россия). Микроскопия

© 2022 г. Супрунчук В.Е.

\* Автор для переписки:

Супрунчук Виктория Евгеньевна

к.х.н., доцент кафедры фармацевтической химии и технологии лекарств, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь  
E-mail: vsuprunchuk@ncfu.ru

образцов с целью выявления размера частиц и их формы проводилась с использованием сканирующего электронного микроскопа Scanning system Tescan Vega 3 (Чехия) с напряжением 5 кэВ. В качестве модельного фермента для загрузки был использован тканевой активатор плазминогена (Actilyse, Германия). Загрузка фермента осуществлялась с помощью глутарового альдегида в присутствии/отсутствии додецилсульфата натрия. Для этого к наночастицам фукоидан/магнетит вносили 0,5%-ный раствор сшивающего агента и выдерживали 30 мин при перемешивании, промывали, а затем вносили фермент. Перемешивание продолжали на ледяной бане в течение 12 ч и трижды промывали 0,1 М фосфатно-солевым буфером. Количество загруженного фермента определяли в супернатанте методом Бредфорда при 595 нм.

### Результаты и обсуждение

Создание наночастиц фукоидан/магнетит осуществлялось за счет электростатического взаимодействия биополимера с наночастицами магнетита. Гидродинамический диаметр полученных пустых частиц составил  $148,6 \pm 22$  нм. При функционализации фукоидана наночастицами магнетита также изменяется электрохимический потенциал поверхности его частиц. Происходит увеличение поверхностной плотности заряда  $-9,83 \pm 0,16$  мВ до  $+10,74 \pm 0,64$  мВ. Гидродинамический диаметр частиц фукоидан/магнетит, загруженных модельным ферментом, составил 370 нм. Иммунизация модельного ферментного препарата осуществлялась с помощью сшивающего агента, в качестве которого был использован глутаровый альдегид. Количество загруженного фермента определяли методом Бредфорда. Включение фермента составило  $2,06 \pm 0,09$  масс. %

Размер загруженных ферментным препаратом частиц был изучен с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 1). Установлено распределение наночастиц фукоидан/магнетит по размеру (рис. 2), где средний диаметр частиц составил  $94,4 \pm 24,3$  нм.

Также при загрузке фермента наблюдается изменение электрохимического потенциала поверхности наночастиц фукоидан/магнетит, который составил  $-1,66 \pm 0,06$  мВ. Такое значение электрохимического потенциала может приводить к агрегации наночастиц в процессе их хранения, поэтому было осуществлено введение поверхностно-активного вещества — додецилсульфата натрия — для предотвращения данных процессов. Результаты, полученные с помощью метода динамического рассеяния света, показали, что размер и заряд поверхности частиц

изменяются при варьировании условий их формирования. Так, при использовании в среде формирования ПАВ размер частиц снижался в 3,1 раза и составил 120 нм, зета-потенциал имел значение, равное  $-9,9 \pm 0,11$  мВ. Таким образом, присутствие анионного ПАВ имеет значительное влияние на величину поверхностной плотности заряда и размер системы фукоидан/магнетит/фермент, что свидетельствует о включении ПАВ в адсорбционную часть двойного электрического слоя.

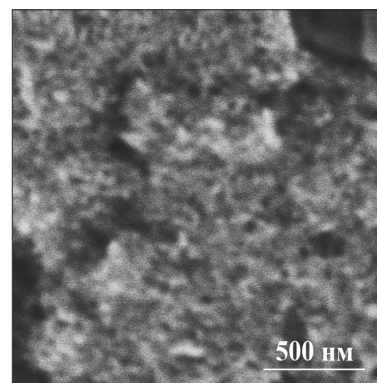


Рис. 1. Фотография наночастиц фукоидан/магнетит, полученная с помощью сканирующей электронной микроскопии

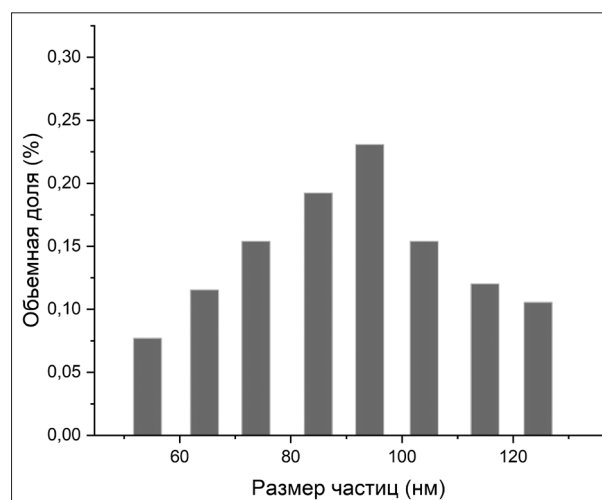


Рис. 2. Распределение загруженных модельным ферментом наночастиц фукоидан/магнетит по данным сканирующей электронной микроскопии

Изменения поверхностных свойств наночастиц также зависят от рН среды, так как реакции протонирования и депротонирования связаны с изменением концентрации поверхностных групп, ответственных за взаимодействие компонентов [7]. При загрузке ферментного препарата наблюдается снижение электрохимического потенциала с ростом значения рН среды, что может свидетельствовать об успешной иммобилизации

фермента. Так, например, при использовании среды с рН 3 значение электрохимического потенциала составило  $4,25 \pm 0,15$  мВ, при рН 7,4 —  $-1,66 \pm 0,06$  мВ, при рН 9 —  $-3,46 \pm 0,2$  мВ.

### Заключение

Таким образом, в работе показана возможность создания наночастиц фукоидан/магнетит, потенциально применимых в качестве носителя ферментных препаратов для их адресной доставки. Размер частиц, по данным сканирующей электронной микроскопии, составил  $94,4 \pm 24,3$  нм. В результате исследования также выявлено, что размер частиц и электрохимический потенциал их поверхности зависят от состава среды и условий их синтеза. В исследовании также было установлено, что введение анионного ПАВ в среду формирования имеет значительное влияние на величину поверхностной плотности заряда и размер системы фукоидан/магнетит/фермент.

### Благодарности

Автор выражает благодарность директору химико-биологического кластера ИТМО, д.х.н. В.В. Виноградову за предоставленную возможность проведения эксперимента.

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам № СП1758.2021.4.

### Литература

1. Супрунчук В.Е. Низкочастотная высокоинтенсивная ультразвуковая обработка сульфатированного полисахарида бурьих водорослей // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. — 2021. — Т. 14. — № 4. — С. 582–592.
2. Drozdov A.S., Ivanovski V., Avnir D., Vinogradov V.V. A universal magnetic ferrofluid: Nanomagnetite stable hydrosol with no added dispersants and at neutral pH // Journal of Colloid and Interface Science 2016; — Vol. 468. — P. 307–312.
3. De Geest B.G., Skirtach A.G., Mamedov A.A., Antipov A.A., Kotov N.A., De Smedt S.C., Sukhorukov G.B. Ultrasound-triggered release from multilayered capsules // Small. — 2007. — Vol. 3. — No. 5. — P. 804–808.
4. Irhimeh M.R., Fitton J.H., Lowenthal R.M. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan // Blood Coagulation and Fibrinolysis. — 2009. — Vol. 20. — No. 7. — P. 607–610.

5. Kreft O., Skirtach A.G., Sukhorukov G.B., Möhwald H. Remote control of bioreactions in multicompartement capsules // Advanced Materials. — 2007. — Vol. 19. — No. 20. — P. 3142–3145.
6. Lu Z., Prouty M.D., Guo Z., Golub V.O., Kumar Ch.S.S.R., Lvov Y.M. Magnetic switch of permeability for polyelectrolyte microcapsules embedded with Co@Au nanoparticles // Langmuir 2005; — Vol. 21. — No. 5. — P. 2042–2050.
7. Matusiak J., Grządka E., Bastrzyk A. Stabilizing properties of fucoidan for the alumina suspension containing the cationic surfactant // Carbohydr Polym. — 2020. — Vol. 245. — Art. 116523. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116523.
8. Pradhan B., Patra S., Nayak R., Behera C., Dash S.R., Nayak S., Sahu B.B., Bhutia S.K., Jena M. Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: A journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agents // International Journal of Biological Macromolecules. — 2020. — Vol. 164. — P. 4263–4278.
9. Skirtach A.G., Karageorgiev P., De Geest B.G., Pazos-Perez N., Braun D., Sukhorukov G.B. Nanorods as wavelength-selective absorption centers in the visible and near-infrared regions of the electromagnetic spectrum // Advanced Materials. — 2008. — Vol. 20. — No. 3. — P. 506–510.
10. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Song H., Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica* // International Journal of Biological Macromolecules. — 2010. — Vol. 46. — P. 6–12.
11. Zhao X., Guo F., Hu J., Zhang L., Xue C., Zhang Z., Li B. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica* // Thrombosis Research. — 2016. — Vol. 144. — P. 46–52.

### References

1. Suprunchuk VE. Nizkochastotnaya vysokointensivnaya ul'trazvukovaya obrabotka sul'fatirovannogo polisakharida burykh vodorosley. Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Khimiya 2021; 14(4):582–592 (in Russian).
2. Drozdov AS, Ivanovski V, Avnir D, Vinogradov VV. A universal magnetic ferrofluid: Nanomagnetite stable hydrosol with no added dispersants and at neutral pH. Journal of Colloid and Interface Science 2016; 468:307–312.
3. De Geest BG, Skirtach AG, Mamedov AA, Antipov AA, Kotov NA, De Smedt SC, Sukhorukov GB. Ultrasound-triggered release from multilayered capsules. Small 2007; 3(5):804–808.
4. Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2009; 20(7):607–610.
5. Kreft O, Skirtach AG, Sukhorukov GB, Möhwald H. Remote control of bioreactions in multicompartement capsules. Advanced Materials 2007; 19(20):3142–3145.

6. Lu Z, Prouty MD, Guo Z, Golub VO, Kumar ChSSR, Lvov YM. Magnetic switch of permeability for polyelectrolyte microcapsules embedded with Co@Au nanoparticles. *Langmuir* 2005; 21(5):2042–2050.
7. Matusiak J, Grządka E, Bastrzyk A. Stabilizing properties of fucoidan for the alumina suspension containing the cationic surfactant. *Carbohydr Polym* 2020; 245:116523. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116523.
8. Pradhan B, Patra S, Nayak R, Behera C, Dash SR, Nayak S, Sahu BB, Bhutia SK, Jena M. Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: A journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agents. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020; 164:4263–4278.
9. Skirtach AG, Karageorgiev P, De Geest BG, Pazos-Perez N, Braun D, Sukhorukov GB. Nanorods as wavelength-selective absorption centers in the visible and near-infrared regions of the electromagnetic spectrum. *Advanced Materials* 2008; 20(3):506–510.
10. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Song H, Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules* 2010; 46:6–12.
11. Zhao X, Guo F, Hu J, Zhang L, Xue C, Zhang Z, Li B. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica*. *Thrombosis Research* 2016; 144:46–52.

## PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF FUCOIDAN/MAGNETITE NANOPARTICLES LOADED WITH A MODEL ENZYME

V.E. SUPRUNCHUK

*North Caucasian Federal University, Stavropol*

In this work, the possibility of creating nanoparticles based on fucoidan modified with magnetite, applicable in the development of targeted delivery systems, was studied. To characterize the synthesized samples of fucoidan/magnetite nanoparticles, we used the method of dynamic light scattering and scanning electron microscopy. The possibility of forming fucoidan/magnetite particles with subsequent loading of the enzyme preparation is shown. In addition, the presence of an anionic surfactant has a significant effect on the magnitude of the surface charge density and the size of the fucoidan/magnetite/enzyme system.

*Keywords:* fucoidan, magnetite, tissue plasminogen activator, nanoparticles, biocomposite.

### Address:

Suprunchuk V.E., Ph.D.

Associate professor of the Department of pharmaceutical chemistry and technology medicines, North Caucasian

Federal University, Stavropol

E-mail: vsuprunchuk@ncfu.ru

### Для цитирования:

Супрунчук В.Е. Физико-химические свойства наночастиц фукоидан/магнетит, загруженных модельным ферментом. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2022; 18(3): 35–38.

### For citation:

Suprunchuk V.E. Physicochemical properties of fucoidan/magnetite nanoparticles loaded with a model enzyme. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(3):35–38 (in Russian).

# КОНСТРУИРОВАНИЕ КОНЪЮГАТОВ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНУ ВИРУСА БЕШЕНСТВА С МЕТКАМИ ФИТЦ И ALEXA FLUOR И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

Ю.К. ГАВРИЛОВА<sup>1\*</sup>, С.В. ГЕНЕРАЛОВ<sup>1</sup>, Е.Г. АБРАМОВА<sup>1,2</sup>,  
Т.Ю. КИРИЛЛОВА<sup>1</sup>, М.Н. КИРЕЕВ<sup>1</sup>, А.Н. СПИЦЫН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора,

<sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов

В ходе исследования сконструированы флуоресцирующие конъюгаты на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства «Москва 3253<sub>Verо</sub>» с флуорохромами ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм). Результаты спектрофотометрического анализа характеристик антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства, флуоресцентных меток и готовых конъюгатов показали возможность контроля процедуры конъюгирования антител с флуоресцирующими метками спектрофотометрическим методом. Установлены оптимальные рабочие разведения экспериментальных конъюгатов при окрашивании инфицированных клеточных культур. Полученные данные подтвердили эффективность применения сконструированных конъюгатов в сравнении с коммерческими антирабическими флуоресцирующими конъюгатами при исследовании инфицированной вирусом бешенства перевиваемой клеточной линии Vero методом прямой иммунофлуоресценции.

**Ключевые слова:** антирабический конъюгат, ФИТЦ, Alexa Fluor, обнаружение вируса бешенства, метод прямой иммунофлуоресценции, спектрофотометрия.

## Введение

Одним из аспектов совершенствования комплекса мер по оказанию населению Российской Федерации антирабической помощи является разработка новых и улучшение характеристик существующих методов контроля качества антирабических препаратов [5]. Контроль специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади, применяемого в качестве средства постэкспозиционной профилактики бешенства у людей, осуществляют в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [9]. При использовании этого метода характерно длительное получение результата (14 сут), а также необходимость в большом количестве стандартных лабораторных животных. Указанные обстоятельства, подкрепленные рекомендациями экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по бешенству [16], определяют

актуальность разработки и внедрения альтернативных методов контроля специфической активности *in vitro*, не уступающих по чувствительности традиционным методам с использованием животных.

Ранее была экспериментально обоснована возможность применения метода детекции вируса бешенства (ВБ) в перевиваемой культуре клеток Vero с целью определения показателя специфической активности антирабических сывороток и готового препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, не уступающего по чувствительности методу *in vivo*, используемому при контроле данного иммунобиологического лекарственного средства [1]. При постановке метода *in vitro* выявление вирусного антигена осуществляли с использованием коммерческого антирабического ФИТЦ-конъюгата, полученного на основе антител к цельному ВБ. Повышению чувствительности разработанного метода может способствовать применение флуоресцирующих антирабических конъюгатов на основе антител к структурным компонентам ВБ, в частности к рибонуклеопротеину (РНП) [11, 15]. По данным исследователей, РНП ВБ обладает наибольшей стабильностью аминокислотной последовательности по сравнению с другими белками вируса, а также специфической антигенной детерминантой, свойственной всем вирусам бешенства [4]. Особенностью жизненного цикла

© 2022 г. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Кириллова Т.Ю., Киреев М.Н., Спицын А.Н.

\* Автор для переписки:

Гаврилова Юлия Кирилловна  
научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов, ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов  
E-mail: ylia-93@list.ru

ВБ в клеточной культуре является накопление рибонуклеопротеина в цитоплазме инфицированных вирусом клеток. Этот факт дает основание полагать, что при использовании флуоресцентных конъюгатов на основе антител к РНП существует возможность обнаружения вируса до начала этапа формирования цельных вирусных частиц, детектируемых при помощи конъюгата на основе антител к цельному ВБ [3, 10, 11, 12, 14].

Целью настоящего исследования явились конструирование флуоресцирующих конъюгатов на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства для применения в реакции вируснейтрализации на культуре клеток и оценка эффективности их применения в тесте *in vitro* в сравнении с коммерческим антирабическим ФИТЦ-конъюгатом.

### Материалы и методы

В проведенных ранее исследованиях были получены кроличьи сыворотки крови, содержащие антитела к РНП ВБ «Москва 3253<sub>Verо</sub>» [2]. Антитела из сывороток выделяли методом осаждения сульфатом аммония [8]. Концентрацию белка в очищенном растворе антител к РНП ВБ «Москва 3253<sub>Verо</sub>» приводили к значению  $22 \pm 2$  мг/мл. Активность выделенных антител анализировали с помощью дот-иммуноанализа (ДИА), регистрируемый титр соответствовал значениям в диапазоне 1:16000 — 1:32000. Далее очищенные антитела применяли для конструирования флуоресцирующих антирабических конъюгатов. Охлажденную воду очищенную (ФС.2.2.0020.18) смешивали с равным объемом сыворотки, а затем в полученный раствор при непрерывном помешивании на магнитной мешалке добавляли насыщенный раствор сернокислого аммония (Вектон, Россия) pH  $7,2 \pm 0,1$  из расчета 45% конечного насыщения. Необходимое количество сульфата аммония для получения 45% насыщения вычисляли по формуле:

$$X = Y \times B \div (100 - B),$$

где: X — необходимое количество (мл) насыщенного раствора сульфата аммония;

Y — общий объем разведенной сыворотки (мл);

B — необходимый процент насыщения.

Колбу с полученным раствором выдерживали 16–18 ч при  $6 \pm 2$  °С для получения осадка, после чего раствор центрифугировали при 2400 g в течение 40–60 мин, а затем удаляли надосадочную жидкость. К полученному осадку добавляли воду очищенную из расчета  $2,5 \pm 0,5$  мл на 1 г осадка, после чего остатки солей удаляли

гель-фильтрацией на колонках с использованием сефадекса G-50 (Sigma-Aldrich, США). Для элюции белка из колонки применяли 0,85%-ный раствор натрия хлорида (Вектон, Россия), содержащий 10% карбонатно-бикарбонатного буфера (Росмедбио, Россия). Контроль очистки иммуноглобулиновой фракции от сернокислого аммония осуществляли с применением 5% сульфосалициловой кислоты и реактива Несслера (Вектон, Россия).

Активность полученных антител устанавливали в дот-иммуноанализе на нитроцеллюлозной мембране (НЦМ, Bio-Rad, США) с применением диагностикума с наночастицами коллоидного золота (14–17 нм) по общепринятой методике [7]. Перед внесением диагностикума осуществляли блокировку свободных сайтов связывания: инкубировали НЦМ в 3%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (ООО «БиолоТ», Россия) в течение 15 мин при температуре 20 °С. В качестве отрицательного контроля при постановке ДИА использовали нормальную сыворотку кролика. НЦМ с образцами сывороток и антигенным диагностикумом инкубировали при комнатной температуре до проявления красных пятен. При необходимости увеличения цветового сигнала исследуемые НЦМ выдерживали в растворе физического проявителя (деионизованная вода; 0,5%-ный раствор лимонной кислоты; 0,2%-ный раствор метола; 0,2%-ный раствор нитрата серебра, Вектон, Россия), после чего промывали, высушивали при комнатной температуре и осуществляли визуальный учет результата анализа.

В качестве флуоресцентных меток для будущих конъюгатов были выбраны флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ, Biotium, США) и Alexa Fluor (532 нм, Monoclonal Antibody Labeling Kit; Thermo-Fisher Scientific, США). Для конъюгирования антител к РНП ВБ с ФИТЦ к 2%-ному раствору антител добавляли краситель в пропорции 2–3 мг ФИТЦ на 100 мг белка [13]. Процедуру конъюгирования проводили при  $7 \pm 3$  °С в течение 17–19 ч при постоянном помешивании на магнитной мешалке. Полученный конъюгат очищали от несвязанного красителя на хроматографической колонке с сефадексом G-50 (Sigma-Aldrich, США). Элюирование меченых антител к РНП ВБ осуществляли 0,85%-ным раствором хлористого натрия с 5%-ным карбонатно-бикарбонатным буфером (pH =  $9,0 \pm 0,1$ , 0,5 моль/л).

Для получения конъюгата антител к РНП ВБ с меткой Alexa Fluor (532 нм) применяли методику фирмы-изготовителя флуорохрома. В пробирку с сухим бикарбонатом натрия добавляли 1 мл деионизованной воды для получения 1 М раствора. К раствору антител



к РНП ВБ с концентрацией белка 1 мг/мл добавляли 0,1 объема приготовленного карбонатно-бикарбонатного буфера. Полученный белковый раствор в количестве 100 мкл переносили в пробирку с флуоресцентной меткой и, плавно переворачивая пробирку, перемешивали ее содержимое. Полученный раствор инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, при этом пробирку также аккуратно переворачивали каждые 10–15 мин с целью повышения эффективности связывания антител с красителем. Очистку конъюгата от несвязавшегося флуорохрома проводили на входящей в набор для получения конъюгата хроматографической колонке с коммерческим носителем с последующим центрифугированием в течение 3 мин при 1100 g на центрифуге СМ-6 (Elmi, Латвия).

Контроль конъюгирования антител с флуорохромами осуществляли в соответствии с методическим подходом, включающим в себя определение спектрофотометрических характеристик антител, красителей и готовых конъюгатов [6]. Спектрометрический анализ проводили на спектрометре HR4000 (Ocean Optics, США), исследуемые образцы вносили в кюветы (12,5×12,5×36 мм, Erpendorf, Германия), используемые для спектрально-фотометрического анализа в диапазоне длин волн от 220 до 1600 нм. С целью исключения спектра растворителя и внешних световых излучений до проведения измерений в программе управления спектрометром сохраняли опорный и темновой спектры, регистрируемые при включенном и выключенном источнике излучения в отношении растворителя. Спектр проходящего через исследуемый образец света регистрировали в 10 повторностях. Полученные результаты анализировали в программном обеспечении Spectra Suite и OriginTM для используемого спектрометра.

Рабочие концентрации полученных конъюгатов устанавливали в сравнении с коммерческим ФИТЦ-конъюгатом антирабического иммуноглобулина (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия) при окрашивании интактной и инфицированной ВБ «Москва 3253<sub>Verо</sub>» перевиваемой клеточной культуры Vero (клетки почки африканской зеленой марышки, ООО «БиолоТ», Россия). В лунки микропланшета вносили равный объем питательной среды, вирусодержащей суспензии и клеточной культуры, исключая зону отрицательного контроля. Планшет с подготовленными образцами инкубировали в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (3 сут при 5% CO<sub>2</sub>, 37 °С), после чего осуществляли окрашивание экспериментальными и коммерческим флуоресцирующими конъюгатами (1 ч при 37 °С).

Конъюгат антител к РНП ВБ «Москва 3253<sub>Verо</sub>» с ФИТЦ исследовали в серийных двукратных раз-

ведениях от 1:10 до 1:160, с Alexa Fluor (532 нм) — в серийных пятикратных разведениях от 1:10 до 1:1250. Коммерческий антирабический ФИТЦ-конъюгат готовили в разведении 1:40, рекомендованном инструкцией по применению.

## Результаты и обсуждение

Техника мечения антител красителем ФИТЦ в настоящее время широко применяется при разработке диагностических тест-систем, в том числе предназначенных для детекции вируса бешенства. Следует отметить, что ФИТЦ имеет относительно высокую скорость фотообесцвечивания, что явилось причиной разработки его производных, в том числе флуорофоров Alexa Fluor, обладающих повышенной фотостабильностью и интенсивностью флуоресценции. Краситель Alexa Fluor успешно применяют в современных исследованиях методом проточной цитометрии, где требуется повышенная стабильность и интенсивность флуоресценции. На рисунках 1 и 2 представлены результаты исследования спектров поглощения антител, красителей и сконструированных флуоресцирующих антирабических конъюгатов методом спектрофотометрии.

Максимальное оптическое поглощение растворов ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм) было установлено в области 495 и 522 нм соответственно. Пиковые значения спектров поглощения растворов антител к РНП ВБ фиксировали в диапазоне от 380 до 460 нм с постепенным снижением в длинноволновой области. При смешивании растворов флуорохромома с антителами получали результирующий спектр поглощения, равный сумме спектров поглощения исходных компонентов, что свидетельствовало об отсутствии связей между ними на момент смешивания, а также отсутствии иных поглощающих компонентов.

После конъюгации белка с флуорохромом отмечали изменение исследуемых спектральных характеристик. Для конъюгатов было характерно наличие двух пиков поглощения, соответствующих белку и связанному красителю. При этом пик, характерный для веществ белковой природы, находился в области поглощения 380–460 нм, но при конъюгации с ФИТЦ смещался в коротковолновую область, а при конъюгации с Alexa Fluor (532 нм) — в длинноволновую область спектра на 20–30 нм. Максимальное значение второго пика поглощения, соответствующего красителю, оставалось неизменным. Наблюдаемое в ходе эксперимента смещение максимума поглощения белкового вещества свидетельствует об успешном завершении конъюгации, выраженной в

образовании связей между антителами и добавленным красителем.

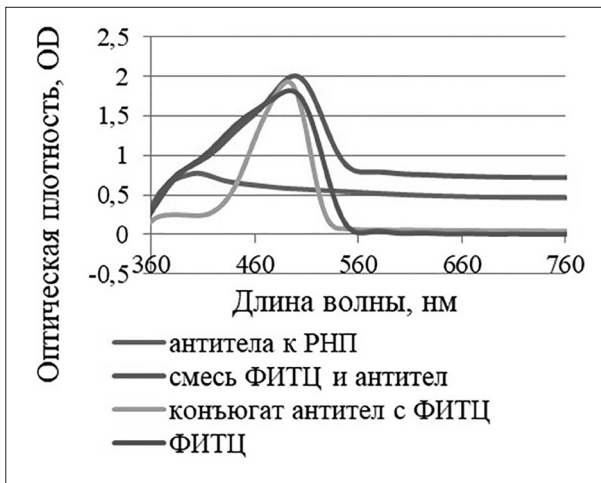


Рис. 1. Исследование спектров поглощения при конъюгировании антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с ФИТЦ

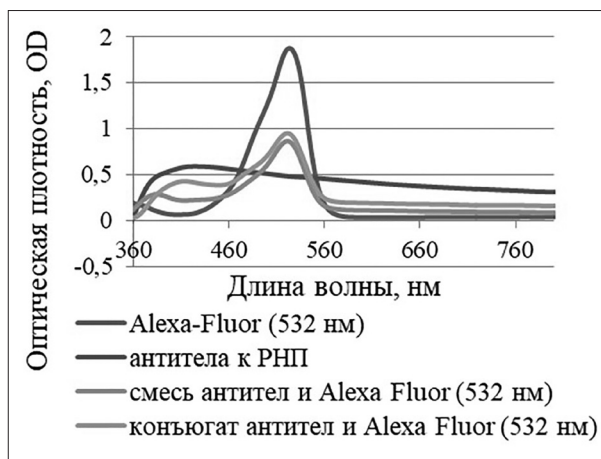


Рис. 2. Исследование спектров поглощения при конъюгировании антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с Alexa Fluor (532 нм)

При окрашивании интактной и инфицированной ВБ «Москва 3253<sub>Vero</sub>» перевиваемых клеток Vero различными разведениями экспериментального ФИТЦ-конъюгата было установлено оптимальное рабочее разведение конъюгата в значении 1:80. При использовании данного разведения конъюгата свечение инфицированных вирусом клеток при визуальном учете оценивали не менее чем на 3 балла, как и в случае окрашивания коммерческим антирабическим ФИТЦ-конъюгатом, взятым в рабочем разведении (рис. 3). При использовании экспериментального конъюгата с большей степенью разведения интенсивность свечения, наблюдаемого в образцах инфицированных вирусом клеток, оценивали на 1–2 балла.

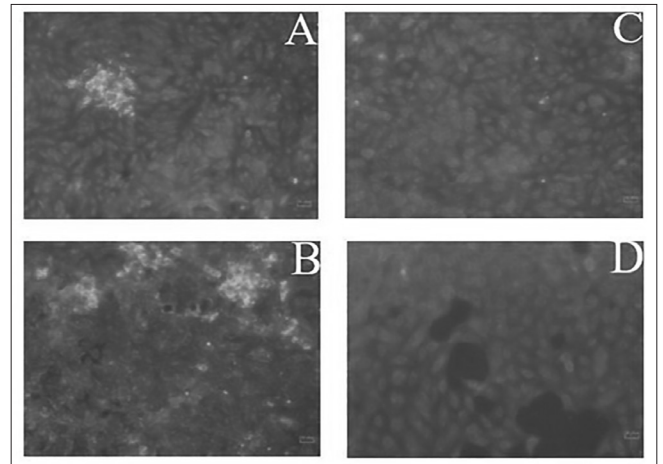


Рис. 3. Сравнение эффективности коммерческого и экспериментального антирабических ФИТЦ-конъюгатов в образцах клеточной культуры Vero, увеличение (200×). А – инфицированная *virus fixe* «Москва 3253<sub>Vero</sub>» клеточная культура Vero, окрашенная коммерческим ФИТЦ-конъюгатом (1:40); В – инфицированная *virus fixe* «Москва 3253<sub>Vero</sub>» клеточная культура Vero, окрашенная экспериментальным ФИТЦ-конъюгатом (1:80); С – интактная клеточная культура Vero, окрашенная коммерческим ФИТЦ-конъюгатом (1:40); D – интактная клеточная культура Vero, окрашенная экспериментальным ФИТЦ-конъюгатом (1:80)

При окрашивании интактной и инфицированной ВБ «Москва 3253<sub>Vero</sub>» перевиваемой культуры клеток Vero экспериментальным Alexa Fluor-конъюгатом в различных разведениях было установлено оптимальное рабочее разведение для данного конъюгата, соответствующее 1:250. В данном разведении конъюгата наблюдали специфическое свечение инфицированных клеток в лунках микропланшета с визуально оцениваемой интенсивностью в 3–4 балла (рис. 4).

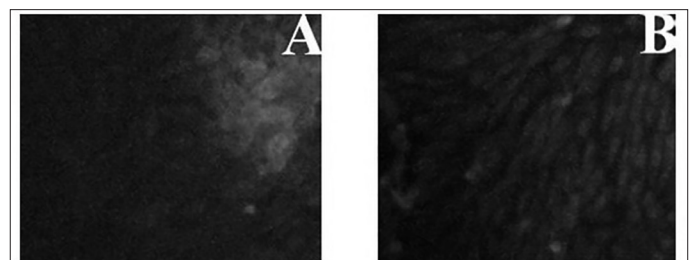


Рис. 4. Образцы инфицированной *virus fixe* «Москва 3253<sub>Vero</sub>» клеточной культуры Vero, окрашенные конъюгатом антирабических антител с Alexa Fluor (532 нм), увеличение (100×). А – окрашенный Alexa Fluor-конъюгатом (532 нм) образец (1:250); В – окрашенный Alexa Fluor-конъюгатом (532 нм) образец (1:1250)

Увеличение степени разведения конъюгата приводило к уменьшению эффективности окрашивания образцов.

### Заключение

Таким образом, были получены флуоресцирующие конъюгаты на основе антител к РНП ВБ «Москва 3253<sub>Vero</sub>» с метками ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм), а также установлены их оптимальные рабочие разведения для исследований в контрольных тестах на клеточной культуре. Интенсивность специфического свечения инфицированной вирусом культуры клеток при окрашивании экспериментальными конъюгатами, взятыми в установленных рабочих разведениях, оказалась сопоставимой с интенсивностью свечения при использовании коммерческого антирабического ФИТЦ-иммуноглобулина, взятого в рабочем разведении. Полученные результаты свидетельствуют о возможности эффективного применения полученных конъюгатов в исследованиях с использованием клеточных культур с целью детекции вируса бешенства или определения активности антирабических сывороток и иммуноглобулина.

### Литература

1. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Кочкин А.В. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции // Биотехнология. — 2018. — Т. 34. — № 4. — С. 83–88.
2. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Киреев М.Н., Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Овчинникова М.В., Кириллова Т.Ю., Семакова А.П. Разработка схемы получения антител к рибонуклеопротеину аттенуированного вируса бешенства // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2019. — № 5. — С. 3–8.
3. Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.А., Лосич М.А., Цибезов В.В., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства // Вопросы вирусологии. — 2013. — Т. 58. — № 5. — С. 38–43.
4. Львов Д.К. Медицинская вирусология: Руководство. — М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2008. — 656 с.
5. Мовсесянц А.А., Бутырский А.Ю., Бондарев В.П., Олефир Ю.В., Постнова Е.Л., Мухачева А.В. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2015. — Т. 84. — № 5. — С. 85–89.

6. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Киреев М.Н., Овчинникова М.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Кочубей В.И. Спектрофотометрическая характеристика конъюгатов иммуноглобулинов для диагностики возбудителей особо опасных инфекций // Оптика и спектроскопия. — 2020. — Т. 128. — № 3. — С. 430–434.
7. Тертон М., Бангхем Д.Р., Колкотт К.А. и др. Новые методы иммуноанализа (под общ. ред. У. Коллинза). — М.: Мир, 1991. — 280 с.
8. Фримель Г. Иммунологические методы. — М.: Медицина, 1987. — 472 с.
9. ФС.3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Фармакопейная статья. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том IV). — М.: ФЭМБ, 2018. — С. 5503–5514.
10. Albertini A.A., Ruigrok R.W., Blondel D. Rabies virus transcription and replication // Advances in Virus Research. — 2011. — Vol. 79. — P. 1–22.
11. Caporale G.M.M., Silva A. de C.R., Peixoto Z.M.P., Chaves L.B., Carrieri M.L., Vassao R.C. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil // J. of Clinical Laboratory Analysis. — 2009. — Vol. 23. — P. 7–13.
12. Fooks A.R., Jackson A.C. Rabies scientific basis of the disease and its management. — Elsevier Science, 4<sup>th</sup> ed., 2020. — 750 p.
13. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4<sup>th</sup> ed. — Geneva: WHO, 1996. — 469 p.
14. Silva G.H., Silva J.H.S., Iamamoto K., Arruda T.S., Katz I.S.S., Fernandes E.R., Guedes F., Rodrigues da Silva A.C., Silva S.R. Performance evaluation of the polyclonal anti-rabies virus ribonucleoprotein IgG antibodies produced in-house for use in direct fluorescent antibody test // J. Virol. Methods. — 2020. — Vol. 280. — Art. 113879. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113879.
15. Um J., Chun B.C., Lee Y.S., Hwang K.J., Yang D.K., Park J.S., Kim S.Y. Development and evaluation of an anti-rabies virus phosphoprotein-specific monoclonal antibody for detection of rabies neutralizing antibodies using RFFIT // PLoS Negl. Trop. Dis. — 2017. — Vol. 11. — No. 12. — Art. e0006084. doi: 10.1371/journal.pntd.0006084.
16. World Health Organization Expert Consultation on Rabies. WHO technical report Series 1012. — Geneva: WHO, 2018. — 183 p.

### References

1. Gavrilo YuK, Generalov SV, Abramova YeG, Savitskaya LV, Galkina MV, Kochkin AV. Ekspress-analiz aktivnosti antirabicheskikh syvorotok i immunoglobulina v kletochnykh kul'turakh metodom immunofluorestsentsii. Biotekhnologiya 2018; 34(4):83–88 (in Russian).

2. Gavrilova YuK, Generalov SV, Kireyev MN, Sharapova NA, Abramova YeG, Savitskaya LV, Ovchinnikova MV, Kirillova TYu, Semakova AP. Razrabotka skhemy polucheniya antitel k ribonukleoproteinu attenuirovannogo virusa beshenstva. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2019; 5:3–8 (in Russian).
3. Gribencha SV, Kozlov AYu, Kostina LV, Yelakov AL, Losich MA, Tsibezov VV, Zaberezhnyy AD, Aliper TI. Polucheniye monoklonal'nykh antitel k nukleoproteinu virusa beshenstva. Voprosy virusologii 2013; 58(5):38–43 (in Russian).
4. L'vov DK. Meditsinskaya virusologiya: Rukovodstvo. Moscow: OOO Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo, 2008: 656 (in Russian).
5. Movsesyants AA, Butyrskiy AYu, Bondarev VP, Olefir YuV, Postnova YeL, Mukhacheva AV. K voprosu o primeneniye geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina dlya spetsificheskoy profilaktiki beshenstva u lyudey. Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika 2015; 84(5):85–89 (in Russian).
6. Spitsyn AN, Utkin DV, Kireyev MN, Ovchinnikova MV, Kuznetsov OS, Yerokhin PS, Kochubey VI. Spektrofotometricheskaya kharakteristika kon'yugatov immunoglobulinov dlya diagnostiki vzbuditeley osobo opasnykh infektsiy. Optika i spektroskopiyay 2020; 128(3):430–434 (in Russian).
7. Terton M, Bangkhem DR, Kolkott KA i dr. Novyye metody immunoanaliza (pod obshch red U Kollinza). Moscow: Mir, 1991: 280 (in Russian).
8. Frimel' G. Immunologicheskiye metody. Moscow: Meditsina, 1987: 472 (in Russian).
9. FS.3.3.1.0038.15 Immunoglobulin antirabicheskii iz syvorotki krovi loshadi. Farmakopeynaya stat'ya. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniye (Tom IV). Moscow: FEMB, 2018: 5503–5514 (in Russian).
10. Albertini AA, Ruigrok RW, Blondel D. Rabies virus transcription and replication. Advances in Virus Research 2011; 79:1–22.
11. Caporale GMM, Silva A de CR, Peixoto ZMP, Chaves LB, Carrieri ML, Vassao RC. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. J. of Clinical Laboratory Analysis 2009; 23:7–13.
12. Fooks AR, Jackson AC. Rabies scientific basis of the disease and its management. Elsevier Science, 4<sup>th</sup> ed, 2020: 750.
13. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: WHO, 1996: 469.
14. Silva GH, Silva JHS, Iamamoto K, Arruda TS, Katz ISS, Fernandes ER, Guedes F, Rodrigues da Silva AC, Silva SR. Performance evaluation of the polyclonal anti-rabies virus ribonucleoprotein IgG antibodies produced in-house for use in direct fluorescent antibody test. J Virol Methods 2020; 280: 113879. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113879.
15. Um J, Chun BC, Lee YS, Hwang KJ, Yang DK, Park JS, Kim SY. Development and evaluation of an anti-rabies virus phosphoprotein-specific monoclonal antibody for detection of rabies neutralizing antibodies using RFFIT. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11(12):e0006084. doi: 10.1371/journal.pntd.0006084.
16. World Health Organization Expert Consultation on Rabies. WHO technical report Series 1012. Geneva: WHO, 2018: 183.

## CONSTRUCTION OF CONJUGATES BASED ON ANTIBODIES TO RABIES VIRUS RIBONUCLEOPROTEIN WITH FITC AND ALEXA FLUOR FLUOROCHROMES AND EVALUATION OF THE POSSIBILITY OF THEIR USE IN CELL CULTURE STUDIES

Yu.K. GAVRILOVA<sup>1</sup>, S.V. GENERALOV<sup>1</sup>, E.G. ABRAMOVA<sup>1,2</sup>,  
T.Yu. KIRILLOVA<sup>1</sup>, M.N. KIREEV<sup>1</sup>, A.N. SPICYN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Russian Research Anti-Plague Institute «Microb» of the Rosпотребнадзор,*  
<sup>2</sup>*Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov*

In the course of the study, fluorescent conjugates based on antibodies to the ribonucleoprotein of the rabies virus «Moscow 3253<sub>Vero</sub>» with FITC and Alexa Fluor (532 nm) fluorochromes were constructed. The results of the spectrophotometric analysis of the characteristics of antibodies to the rabies virus ribonucleoprotein, fluorescent tags and ready-made conjugates, showed the possibility of controlling the procedure for conjugating antibodies with fluorescent tags by the spectrophotometric method. Optimal working dilutions of experimental conjugates during staining of infected cell cultures have been established. The obtained data confirmed the effectiveness of the use of the designed conjugates in comparison with commercial anti-rabies fluorescent conjugates in the study of a Vero transferable cell line infected with rabies virus by direct immunofluorescence.

*Keywords:* anti-rabies conjugate, FITC, Alexa Fluor, rabies virus detection, direct immunofluorescence method, spectrophotometry.

**Address:**

Gavrilova Yu.K.

Researcher at the laboratory of preventive immunoglobulins  
of the Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»

of the Rospotrebnadzor, Saratov

E-mail: ylia-93@list.ru

**Для цитирования:**

Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Кириллова Т.Ю., Киреев М.Н., Спицын А.Н. Конструирование конъюгатов на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с метками ФИТЦ и Alexa Fluor и оценка возможности их применения в исследованиях на клеточных культурах. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):39–45.

**For citation:**

Gavrilova Yu.K., Generalov S.V., Abramova E.G., Kirillova T.Yu., Kireev M.N., Spicyn A.N. Construction of conjugates based on antibodies to rabies virus ribonucleoprotein with FITC and Alexa Fluor fluorochromes and evaluation of the possibility of their use in cell culture studies. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):39–45 (in Russian).

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СПИРТА С ДРОЖЖАМИ МЕСТНОЙ СЕЛЕКЦИИ

Н.Ф. БИРАГОВА\*, Н.А. ТИНИКАШВИЛИ, Д.А. БИРАГОВ

ФГБОУ «Северо-Кавказский горно-металлургический институт»  
(государственный технологический университет), Владикавказ

Впервые исследовано влияние различных ферментных препаратов с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* ДМ-2, ВКПМ – У-3415 на получение спирта из крахмалсодержащего сырья. На основании изученных литературных данных и собственных экспериментов был выбран фермент Saczyme-AS и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* ДМ-2, ВКПМ – У-3415, обладающие интенсивностью осахаривания и сбраживания просяного суслу. Установлены основные оптимальные условия для брожения просяного суслу  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=4,5-5,3$ .

*Ключевые слова:* просо, ферментные препараты, дрожжи, спирт.

### Введение

В последнее время были достигнуты большие успехи в области технологии ферментов. Был расшифрован механизм их действия на природные субстраты, установлены закономерности функционирования комплексных ферментных систем, которые участвуют в последовательных превращениях субстратов. Выявлен характер влияния коллоидно-химических факторов на кинетику ферментативных реакций в полидисперсных системах, образующихся при переработке растительного сырья. Это позволило продвинуть создание теоретической базы ферментации растительного сырья. При производстве спирта из крахмалсодержащего сырья используются ферменты с амилолитической, цитолитической и протеолитической активностью. Поскольку выход спирта в значительной мере зависит от полноты осахаривания исходного сырья, то применение солода и ферментов имеет актуальное значение. В процессе подваривания большая часть крахмала, которая содержится в сырье, клейстеризуется, сильно повышая вязкость, препятствующую полному развариванию и клейстеризации. Использование  $\alpha$ -амилаз невысокой термо-

стабильности ведет к разжижению замеса. Полное осахаривание разжиженного крахмала достигается с помощью микробной глюкоамилазы, что дает возможность повысить степень осахаривания сырья и в дальнейшем сократить процесс брожения за счет изменения равновесия ферментативной реакции. Поскольку в производстве алкогольсодержащих напитков ферментные препараты глюкоамилазы, определяющие скорость и глубину сбраживания суслу, имеют широкое применение, то выбор комплекса ферментных препаратов с определенной дозировкой каждого имеет решающее значение.

В качестве крахмалсодержащего сырья нами было выбрано просо. По химическому составу просо мало чем отличается от других зерновых культур. По содержанию крахмала и по содержанию пленок оно наиболее приближено к ячменю, по количественному содержанию незаменимых аминокислот – к кукурузе. Химический состав проса не постоянен. Заметно колеблется количество клетчатки (10–14%) в зависимости от пленчатости зерна, белка (10–15%) – от условий произрастания и сорта, а также содержание других веществ. Необходимо отметить, что вещества, входящие в состав проса, имеют некоторые особенности. Жир темный, с высоким кислотным числом, относится к нестойким при хранении жирам. Белки не вполне полноценны по аминокислотному составу, почти не содержат триптофана, плохо набухают в холодной воде, не образуют связного теста. Крахмал клейстеризуется сравнительно медленно, при варке сильно набухает и увеличивается в объеме.

© 2022 г. Бирагова Н.Ф., Тиникашвили Н.А., Бирагов Д.А.

\* Автор для переписки:

Бирагова Нателла Фёдоровна

д.т.н., профессор кафедры «Химия и промышленная биотехнология», Северо-Кавказский горно-металлургический институт (государственный технологический университет)

E-mail: biragova-nf@mail.ru

## Материалы и методы

Все показатели промежуточных и конечного продуктов определяли согласно методам, принятым в теххимическом контроле спиртового производства.

В работе использовалось: сырье — просо крахмалистостью 53,9% и влажностью 13,2%. На стадии разваривания и осахаривания применялись ферментные препараты: Termamyl-AS, Saczyme-AS, NS 25008-AS, Shearzym-AS. Для проведения процесса брожения были взяты дрожжи культуры *Saccharomyces cerevisiae* штамм — ДМ-2 номер расы ВКПМ — Y-3415.

Исследование проводилось по технологической схеме, принятой в спиртовом производстве. Зерновое сусло было сброжено за 70 часов. Объектами исследования были выбраны образцы сусла с применяемыми

ферментными препаратами, имеющие высокие физико-химические показатели. Полученные образцы были обработаны согласно методам, принятым в спиртовом и ликероводочном производстве.

## Результаты

При микроскопировании отмечена активная жизнедеятельность дрожжевых клеток штамма ДМ-2 вида *Saccharomyces cerevisiae* расы Y-3415, с преобладанием округлых и овальных форм.

Результаты исследований представлены в виде графиков и таблиц, характеризующих:

- прирост количества почкующихся клеток (рис. 1);
- прирост гликогена (рис. 2);
- прирост биомассы дрожжей (рис. 3);
- определение видимой концентрации СВ (рис. 4).

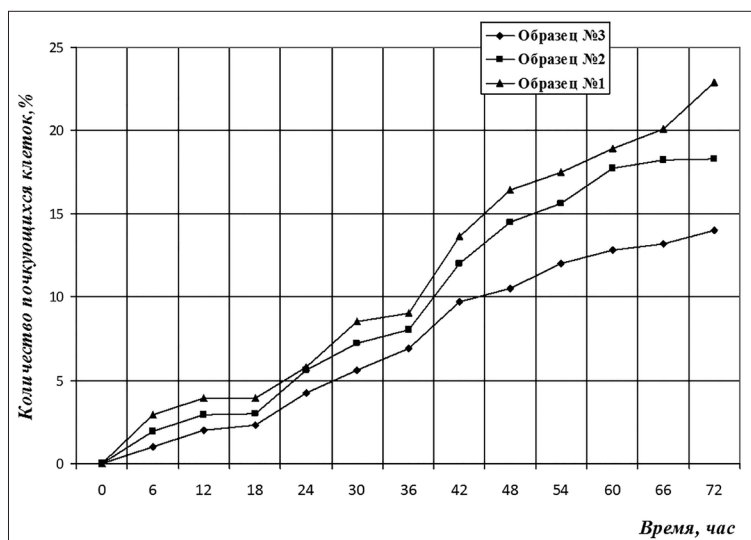


Рис 1. Прирост количества почкующихся клеток

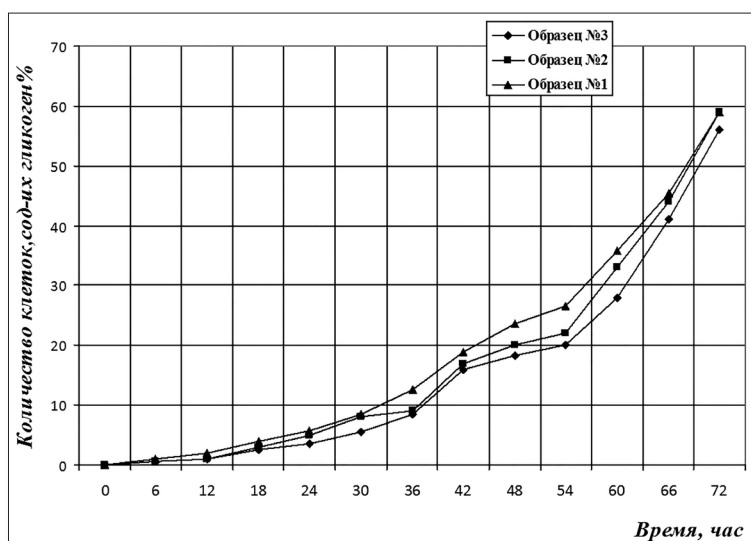


Рис 2. Прирост гликогена

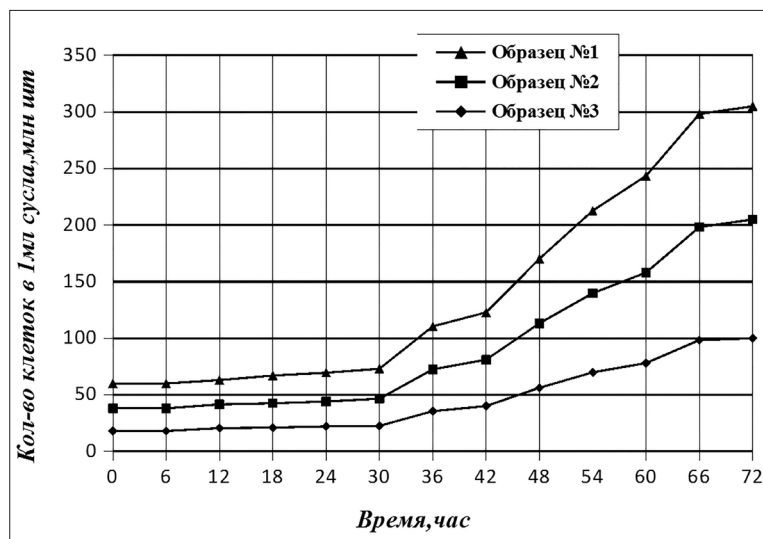


Рис 3. Прирост биомассы дрожжей.

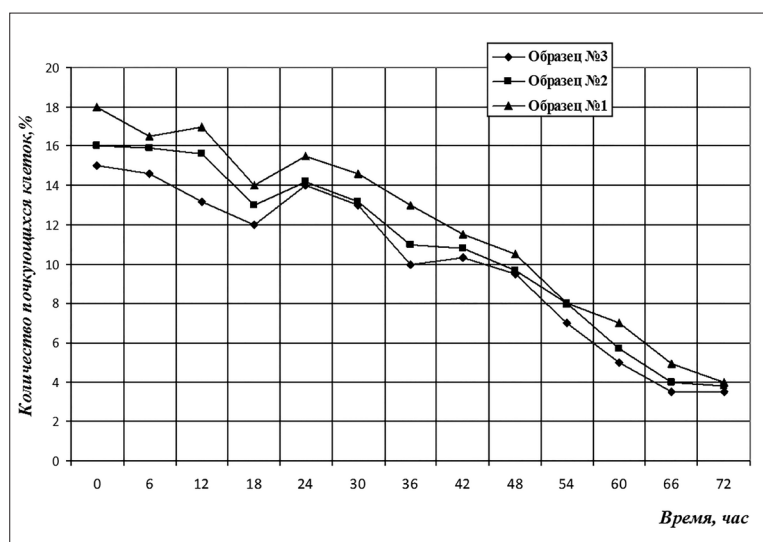


Рис 4. Определение видимой концентрации СВ.

Выявлены основные оптимальные условия для брожения просяного сула:  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=4,5-5,3$ . Обнаружено, что у зрелых дрожжей гликоген занимает от 1/3 до 2/3 клеток.

При общей оценке результатов на основании проведенного эксперимента было установлено, что бражка, полученная с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамм — ДМ-2 номер расы ВКПМ — Y-3415 и с ферментным препаратом Saczyme-AS содержит 9,5% спирта.

### Заключение

Применение ферментного препарата Saczyme-AS позволяет эффективно и быстро провести конверсию декстринов (их содержание в просе 3,5–9%) в сбраживаемые сахара. Характеристики и разработка Saczyme-AS гарантирует следующие преимущества:

- Эффективное разрушение декстринов.
  - Пониженный риск инфекции вследствие работы при высоких температурах ( $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
  - Низкая стоимость обработки и дозировка.
  - Сокращение затрат на логистику вследствие поставок высококонцентрированного препарата.
- Saczyme-AS может использоваться одновременно на стадии осахаривания и сбраживания.

В целом, оценивая результаты проведенных исследований, был сделан вывод о целесообразности применения ферментного препарата Saczyme-AS при производстве спирта из крахмалсодержащего сырья (просо) с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамм — ДМ-2 номер расы ВКПМ — Y-3415. Полученные результаты целесообразно применять в агропромышленном комплексе.

Необходимая литература представлена в нижеприведенном списке (1–10).



## Литература

1. Бирагова Н.Ф., Тиникашвили Н.А., Гацунаева М.М. Усовершенствование технологии получения этанола с использованием новой расы дрожжей / Сб. научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции. Москва, 31 января 2013 г. — М.: 2013. — С. 114–117.
2. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Серба Е.М., Мартыненко Н.Н. Влияние гидролитических ферментов на состав концентрированного зернового сусла // Ж. «Пиво и напитки». — 2018. — № 6. — С. 14–17.
3. Янова М.Я., Колесникова Н.А., Мучкина Е.Я. Исследование проса и продуктов его переработки // Вестник КрасГАУ. — 2015. — № 11. — С. 130–134.
4. Ajibola F.O., Edema M.O., Oyewole O.B. Enzymatic production of ethanol from cassava starch using two strains of *Saccharomyces cerevisiae* // NIFOG. — 2012. — Vol. 30. — No. 2. — P. 114–121.
5. Biragova N.F., Tinikashvili N.A., Dmitrieva T.V. Studying the impact of heavy metals on the composition of the food and processing industry wastewater in the Republic of North Ossetia-Alania // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vladivostok, 06–09 October 2020. — Vladivostok, 2021. — P. 042060. doi: 10.1088/1755-1315/666/4/042060.
6. Biragova N.F., Tinikashvili N.A., Dmitrieva T.V. Wastewater treatment for food processing industries // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: International Science and Technology Conference «EarthScience», Russky Island, 10–12 December 2019. — Vol. 459(4), Chapter 3. — Russky Island: Institute of Physics Publishing, 2020. — P. 042023. doi: 10.1088/1755-1315/459/4/042023.
7. Eldarov M.A., Avdanina D.A., Shalamitskii M.Y., Ivanova E.V., Tanashchuc T.N., Kishkovskaya S.A., et al. Polymorphism of the iron homeostasis genes and iron sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* flor and wine strains // Microbiology. — 2019. — Vol. 88(2). — P. 200–205.
8. Kehu Li, Tongze Zhang, Shwetha Narayanamoorthy, Can Jin, Zhongquan Sui, Shunguo Li, Kao Wu, Guoqing Liu, Harold Corke. Diversity analysis of starch physicochemical properties in 95 proso millet (*Panicum miliaceum* L.) // Food Chemistry. — 2020. — Vol. 324. — Art. 126863. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126863.
9. Murata Y., Nwuche Ch.O., Nweze J.E., et al. Potentials of multi-stress tolerant yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii* for fuel ethanol production from industrial cassava wastes // Process Biochemistry. — 2021. — Vol. 111. — Part 2. — P. 305–314.
10. Xin Bian et al. Effect of fermentation on the structure and physical properties of glutinous proso millet starch // Food Hydrocolloids. — 2021. — Vol. 123(3). — Art. 107144. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.107144.

## References

1. Biragova NF, Tinikashvili NA, Gatsunayeva MM. Usovershenstvovaniye tekhnologii polucheniya etanola s ispol'zovaniyem novoy rasy drozhzhey. Sb nauchnykh trudov po materialam Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Moskva, 31 yanvarya 2013 g. Moscow: 2013: 114–117 (in Russian).
2. Rimareva LV, Overchenko MB, Ignatova NI, Serba YeM, Martynenko NN. Vliyaniye gidroliticheskikh fermentov na sostav kontsentrirrovannogo zernovogo susla. ZH «Pivo i napitki» 2018; 6:14–17 (in Russian).
3. Yanova MYa, Kolesnikova NA, Muchkina YeYa. Issledovaniye prosa i produktov yego pererabotki. Vestnik KrasGAU 2015; 11:130–134 (in Russian).
4. Ajibola FO, Edema MO, Oyewole OB. Enzymatic production of ethanol from cassava starch using two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. NIFOG 2012; 30(2):114–121.
5. Biragova NF, Tinikashvili NA, Dmitrieva TV. Studying the impact of heavy metals on the composition of the food and processing industry wastewater in the Republic of North Ossetia-Alania. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vladivostok, 06–09 October 2020. Vladivostok, 2021: 042060. doi: 10.1088/1755-1315/666/4/042060.
6. Biragova NF, Tinikashvili NA, Dmitrieva TV. Wastewater Treatment for food processing industries. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: International Science and Technology Conference «EarthScience», Russky Island, 10–12 December 2019. 459(4), Chapter 3. Russky Island: Institute of Physics Publishing, 2020: 042023. doi: 10.1088/1755-1315/459/4/042023.
7. Eldarov MA, Avdanina DA, Shalamitskii MY, Ivanova EV, Tanashchuc TN, Kishkovskaya SA, et al. Polymorphism of the iron homeostasis genes and iron sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* flor and wine strains. Microbiology 2019; 88(2):200–205.
8. Kehu Li, Tongze Zhang, Shwetha Narayanamoorthy, Can Jin, Zhongquan Sui, Shunguo Li, Kao Wu, Guoqing Liu, Harold Corke. Diversity analysis of starch physicochemical properties in 95 proso millet (*Panicum miliaceum* L.). Food Chemistry 2020; 324: 126863. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126863.
9. Murata Y, Nwuche ChO, Nweze JE, et al. Potentials of multi-stress tolerant yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii* for fuel ethanol production from industrial cassava wastes. Process Biochemistry 2021; 111(Part 2):305–314.
10. Xin Bian et al. Effect of fermentation on the structure and physical properties of glutinous proso millet starch. Food Hydrocolloids 2021; 123(3): 107144. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.107144.

## THE USE OF ENZYME PREPARATIONS IN THE PRODUCTION OF ALCOHOL WITH LOCAL SELECTION OF YEAST

N.F. BIRAGOVA, N.A. TINIKASHVILI, D.A. BIRAGOV

*North Caucasian mining and metallurgical institute (State technological university), Vladikavkaz*

For the first time, the effect of various enzyme preparations with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* DM-2, VKPM - Y-3415 on the production of alcohol from starch-containing raw materials was studied. Based on the studied literature data and our own experiments, the Saczyme-AS enzyme and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* DM-2, VKPM – Y-3415 were selected, which have the intensity of saccharification and fermentation of millet wort. The main optimal conditions for the fermentation of millet wort  $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=4.5\text{--}5.3$  have been established.

*Keywords:* millet, enzyme preparations, yeast, alcohol.

### **Address:**

Biragova N.F., Doctor of Technical Sciences,  
Professor of the department of chemistry and industrial  
biotechnology, North Caucasus mining and metallurgical  
institute (State technological university), Vladikavkaz  
E-mail: biragova-nf@mail.ru

### **Для цитирования:**

Бирагова Н.Ф., Тиникашвили Н.А., Бирагов Д.А. Использование ферментных препаратов при производстве спирта с дрожжами местной селекции. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):46–50.

### **For citation:**

Biragova N.F., Tinikashvili N.A., Biragov D.A. The use of enzyme preparations in the production of alcohol with local selection of yeast. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):46–50 (in Russian).

**РАСТЕНИЯ – ИНГИБИТОРЫ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS***Е.С. ЯЦЕНКО, Е.А. ЛЕЙТЕС\*, В.А. ПЕТУХОВ, А.А. ПЕТУХОВ,  
А.В. ЕРМАКОВА, Ю.А. ПОТАПКИНА, С.И. КРАСНИКОВА*Алтайский государственный университет, Алтайский филиал ФГБУ ЦНМВЛ, Барнаул*

В статье представлены результаты исследования ингибиторной активности растений на штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Показано, что наиболее эффективными ингибиторами являются золототысячник, женьшень (корень), папайя, шлемник и особенно лимонник (плоды). Причиной воздействия растительных добавок на *Pseudomonas fluorescens*, в основном, вероятно, являются эфирные масла и флавоноиды.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas fluorescens*, растения-ингибиторы, антибактериальные свойства, лимонник, женьшень, папайя, шлемник.

**Введение**

Значительный объем работ по изучению бактерий семейства *Pseudomonas* подгруппы *fluorescens* посвящен *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. syringae*; штаммы же *P. fluorescens* не привлекали особого внимания [18]. Однако в последнее время появляется больше работ, посвященных *P. fluorescens*, что связано с тем, что *Pseudomonas fluorescens* представляет собой одну из самых разнообразных групп внутри рода *Pseudomonas* и может, с одной стороны, защищать сельскохозяйственные культуры, их семена и корни от микроорганизмов, а, с другой, способствовать порче разнообразных продуктов. Все больше данных свидетельствует о том, что некоторые штаммы *P. fluorescens* относятся к членам микробиоты человека и взаимодействуют с человеком-хозяином таким образом, что это способствует возникновению определенных хронических заболеваний, таких как сепсис, септический шок и внутрисосудистое свертывание крови [20]. Известны данные взаимодействия с клетками человека *in vitro* [15]. Кроме того, они часто описываются как портящие молоко и свежий сыр [4].

*Pseudomonas fluorescens* регулярно загрязняет пищевые продукты, готовые к употреблению. Эти микроскопические организмы демонстрируют широкий выбор температуры роста, и загрязнение является

ключевой проблемой обычных и охлажденных пищевых продуктов [14]. Качество сырых овощей, обработка, система упаковки и температура хранения служат важными факторами, влияющими на микробный состав конечного продукта. Биотипы *P. fluorescens* I, II и III также были идентифицированы благодаря протеолитической и липолитической активности в молоке, говяжьей фарше, курятине и рыбе [13]. *P. fluorescens* — это наиболее распространенный загрязнитель молочных танков, он обнаруживает липолитическую, протеолитическую и лецитиназную активность [8]. *P. fluorescens* считается преобладающей и наиболее вредоносной микробиотой при хранении сырого молока в холодильнике [23]. При хранении молочного продукта термостойкие ферменты *P. fluorescens* не только остаются активными после тепловой стерилизации, вызывая горечь молока, осадок и гелеобразование, но и образуют биопленку на поверхности оборудования и инструментов в линии производства молочной продукции [21]. Как только биопленка образуется *Pseudomonas* бактериями, их трудно удалить с помощью гигиенических обработок при переработке сырого молока. Образующаяся биопленка, рост которой облегчен доступностью питательных веществ, вызывает коррозию трубопроводов, способствует росту патогенов, угрожающих здоровью потребителей.

Исследование тормозной активности растений показывает, что многие из них обладают выраженными антибактериальными свойствами, поскольку растения выработали большое число разнообразных химических стратегий для борьбы с атаками патогенов. Действующими веществами могут выступать флавоноиды, эфирные масла, дубильные вещества, алкалоиды, терпены, фенольные соединения и др. Например, сравнение

© 2022 г. Яценко Е.С., Лейтес Е.А., Петухов В.А., Петухов А.А., Ермакова А.В., Потапкина Ю.А., Красникова С.И.

\* **Автор для переписки:**

Лейтес Елена Анатольевна,  
к.х.н., доцент кафедры техносферной безопасности и аналитической химии Алтайского государственного университета, Барнаул  
E-mail: leites-elena@yandex.ru

экстрактов разных частей таких аюрведических растений, как куркума, корица, банан, манго, красный перец, эвкалипт и род *Musa* семейства Банановых в отношении *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus*, показало, что куркума оказывает наиболее выраженное действие, корица также обладает высокой антибактериальной активностью, красный перец не проявил достоверных антибактериальных свойств. В экстрактах содержатся такие вещества, как эфирные масла, танины, сапонины, флавоноиды, фенолы, алкалоиды и горечи. В целом, как заключают авторы, эти результаты подтверждают назначение указанных лекарственных растений в традиционной медицине [5]. Среди экстрактов куркумы, корицы и чеснока водный экстракт чеснока показал максимальную антибактериальную активность относительно *E. coli* и *Bacillus subtilis* [16].

В последние годы экстракты ароматических растений широко используются в области консервирования пищевых продуктов [6]. В настоящее время многие из наиболее широко используемых пищевых консервантов являются синтетическими продуктами. Однако синтетические продукты имеют много недостатков, такие как потенциальная канцерогенность, тератогенность, загрязнение окружающей среды и острая токсичность [9]. В связи с этим развивается тенденция перехода к натуральным пищевым добавкам, которыми можно заменить синтетические химические добавки [10].

Эфирные масла представляют собой идеальным выбором из-за их значительных антибактериальных свойств и безопасности [7]. Эфирные масла представляют собой природные антимикробные агенты, обнаруженные во многих растениях, и являются основной причиной антимикробных свойств экстрактов ароматических растений [6].

В исследовании тормозящей активности нескольких эфирных масел фенхеля, двух видов мяты базилика, трех видов душицы, а также отдельных компонентов эфирных масел препараты лекарственных растений подвергали скринингу на 10 изолированных штаммах *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазу, что делает этот микроорганизм устойчивым ко многим антибиотикам. Все эфирные масла и компоненты оказали значительное антибактериальное действие, превосходящее не только действие ампициллина, к которому бактерии были устойчивы, но также и офлаксацина [17].

Линалоол, также известный как 3,7-диметил-1,6-октадиен-3-ол, монотерпеновый спирт, который содержится в эфирных маслах, экстрагированных из более чем 200 растений по всему миру, таких как *Thymus vulgaris* (тимьян) и *Juniperus communis*

(можжевельник) [3, 19], проявляет антиоксидантную, противовоспалительную и противораковую активность, обнаруживает антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924 и *Escherichia coli* NCTC 12923 [12] и широко используется в фармацевтике, косметике и пищевых добавках [7].

В связи с вниманием потребителей к безопасности пищевых продуктов натуральные и безопасные эфирные масла стали популярным предметом исследований в области сохранения пищевых продуктов. В рассматриваемом исследовании изучались антибактериальная активность и механизм действия линалоола на *P. fluorescens*. Результаты показали, что линалоол оказывает значительное ингибирующее действие на *P. fluorescens*. Линалоол сначала воздействует на клеточную мембрану, нанося повреждение структуре и функции клеточной мембраны и вызывая утечку внутриклеточных макромолекул. Кроме того, линалоол, по-видимому, влияет на активность некоторых внутриклеточных ферментов, тормозя активность ферментов, связанных с циклом ТСА и путем гликолиза. Кроме того, линалоол также ингибирует АТФ и дегидрогеназу дыхательной цепи, тем самым затормаживая выработку АТФ и клеточное дыхание. То есть линалоол действует во многих из вышеупомянутых путей, что приводит к аномальной клеточной структуре и метаболической функции и вызывает гибель клеток. Таким образом, линалоол служит кандидатом в качестве эффективного натурального пищевого консерванта и многофункциональной пищевой добавки [11].

Целью настоящей работы является изучение влияния растительных экстрактов на ингибирование роста *P. fluorescens*, выращиваемых в предложенной [2] питательной среде.

## Материалы и методы

В работе использован штамм микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Для стерилизации применяли стерилизатор паровой автоматический ВКа-75-ПЗ. Культивирование микроорганизмов проводили в шейкере-инкубаторе «Innova 44».

## Результаты и обсуждение

Для глубинного культивирования микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* AP-33 применяли питательную среду следующего состава: меласса, горох шлифованный, фосфат калия, сульфат магния, сульфат железа (III), ни-

трат аммония, растительный экстракт (перечень экстрактов представлен в таблице 1), вода. Растительное сухое сырье в количестве 10 г на 1 л каждого экстракта вносили после стерилизации в автоклаве. Значение рН выдерживали в пределах 7,5–7,6. Время стерилизации составляло 30 мин. при давлении 1 Ваг. После автоклавирования питательную среду остужали до комнатной температуры и фильтровали. Культивирование микроорганизмов

осуществлялось 20–24 часа при температуре  $-28 \pm 2$  °С с принудительной аэрацией со скоростью вращения 125 об./мин в шейкере-инкубаторе «Innova 44». Опыты воспроизводили трижды. Численность микроорганизмов оценивалась методом стандартных десятикратных разведений с высевом в стерильных условиях в чашки Петри на агаризованную среду вышеуказанного состава. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Влияние растительных экстрактов на количество *Pseudomonas fluorescens* AP -33 в процессе культивирования**

№	Растительный препарат	КОЕ/мл $\times 10^{-8}$	
1	Шиповник (лист)	<i>Rosa canina</i>	20 $\pm$ 10
2	Золототысячник	<i>Centáurium erythraea</i>	10 $\pm$ 5
3	Черника (лист)	<i>Vaccínium myrtíllus</i>	50 $\pm$ 10
4	Чага	<i>Fungus betulinus</i>	50 $\pm$ 10
5	Женьшень (корень)	<i>Panax ginseng</i>	15 $\pm$ 5
6	Олива (лист)	<i>Olea europaea</i>	40 $\pm$ 10
7	Грейпфрут (косточки)	<i>Citrus paradisi</i>	20 $\pm$ 5
8	Черемша	<i>Allium ursinum</i>	50 $\pm$ 10
9	Зверобой	<i>Hypericum perforatum</i>	20 $\pm$ 5
10	Подорожник (оболочка семени)	<i>Plantago major</i>	50 $\pm$ 10
11	Лимонник (плоды)	<i>Schisandra chinensis</i>	5 $\pm$ 5
12	Крушина	<i>Frangula alnus</i>	30 $\pm$ 10
13	Папайя	<i>Carica papaya</i>	10 $\pm$ 5
14	Шлемник	<i>Scutellaria galericulata</i>	10 $\pm$ 5
15	Толокнянка (лист)	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	40 $\pm$ 10
16	Красная щетка	<i>Rhodiola quadrifida</i>	30 $\pm$ 5
17	Ива (кора)	<i>Salix alba</i>	40 $\pm$ 10
18	Боровая матка	<i>Orthilia secunda</i>	40 $\pm$ 10
19	Крапива двудомная	<i>Urtica dioica</i>	40 $\pm$ 10
20	Спирулина	<i>Spirulina platensis</i>	50 $\pm$ 10
21	Брусника	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	40 $\pm$ 10
22	Без добавления растительных экстрактов		50 $\pm$ 10

Из таблицы 1 видно, что некоторые растительные добавки, такие как черника (лист), чага, черемша, подорожник (оболочка семени), спирулина, не влияют на подавление или рост бактерий *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Брусника, крапива двудомная, боровая матка, ива (кора), толокнянка (лист), олива (лист) снижают активность бактерий на 20%, а шиповник (лист), грейпфрут (косточки), зверобой, красная щетка — на 40–60%. Наиболее эффективными ингибиторами являются золототысячник, женьшень (корень), папайя, шлемник и особенно лимонник (плоды).

**Заключение**

Причиной воздействия растительных добавок на *Pseudomonas fluorescens*, в основном, вероятно, являются эфирные масла и флавоноиды. Так, эфирное масло лимонника на 60% (по весу) состоит из сесквитерпеновых углеводов [1]. Кроме того, в составе эфирного масла этими авторами обнаружены жирные (или алифатические) терпены в количестве 4% (вес), моноциклические терпены (около 13,5% — вес) и бициклические терпены ряда пинана (более 3% — вес) и ряда камфана (более

4,6% — вес). Также в составе эфирного масла присутствуют эфиры: уксусный эфир борнеола — борнилацетат (9,2% — вес) и метоксицимол (около 2% — вес). Папайя и золототысячник также содержат эфирные масла. В эфирном масле шлемника имеются сесквитерпеновые углеводороды и флавоноиды [24]. До 80% эфирных масел корня женьшеня составляют сесквитерпены, из которых наибольшая доля (до 5–6%) приходится на фарнезол [22].

Таким образом, можно заключить, что вероятнее всего ингибирующее воздействие на *Pseudomonas fluorescens* AP-33 оказывают флавоноиды и составляющие части эфирных масел растений, в частности — сесквитерпены.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Алтайского государственного университета, проект № 16/22-ВГ.

## Литература

1. Кротова И.В., Ефремов А.А. Исследование химического состава плодов лимонника китайского // Химия растительного сырья. — 1999. — № 4. — С. 131–133.
2. Яценко Е.С., Ширманов М.В., Евдокимов И.Ю., Бойко С.С., Дурникин Д.А. Питательная среда для культивирования *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Патент на изобретение RU 2678133 C1, 23.01.2019.
3. Aprotosoaie A.C., Hăncianu M., Costache I.-I., and Miron A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties // Flav. Fragran. J. — 2014. — Vol. 29. — P. 193–219.
4. Baruzzi F., Lagonigro R., Quintieri L., Morea M., Caputo L. Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese // Food Microbiol. — 2012. — Vol. 30. — No. 1. — P. 37–44.
5. Bisht S.S., Ramani Priya K., Mishra R., Panda A.K., Praveen B. Antimicrobial properties of few plants used in traditional system of medicine // International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy. — 2012. — Vol. 3. — No. 4. — P. 563–564.
6. Brenes A., and Roura E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action // Anim. Feed Sci. Technol. — 2010. — Vol. 158. — P. 1–14. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007.
7. Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A., and Ricke S.C. Essential oils as antimicrobials in food systems — a review // Food Control. — 2015. — Vol. 54. — P. 111–119.
8. Decimo M., Morandi S., Silvetti T., Brasca M. Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk // J. Food Sci. — 2014. — Vol. 79. — No. 10. — P. M2081–M2090.
9. Faleiro M.L. The mode of antibacterial action of essential oils / In: Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas ed. — Portugal: University of Algarve, 2011. — P. 1143–1156.
10. Fratianni F., De Martino L., Melone A., De Feo V., Coppola R., and Nazzaro F. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils // J. Food Sci. — 2010. — Vol. 75. — P. M528–M535. doi: 0.1111/j.1750-3841.2010.01791.x.
11. Guo F., Chen Q., Liang Q., Zhang M., Chen W., Chen H., Yun Y., Zhong Q., Chen W. Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens* // Front Microbiol. — 2021. — Vol. 12. — Art. 562094. doi: 10.3389/fmicb.2021.562094.
12. Herman A., Tambor K., and Herman A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils // Curr. Microbiol. — 2016. — Vol. 72. — P. 165–172.
13. Keskin D., Ekmekçi S. Investigation of the incidence of *Pseudomonas* sp. in foods // Hacett. J. Biol. Chem. — 2007. — Vol. 35(3). — P. 181–186.
14. Kumar H., Franzetti L., Kaushal A. et al. *Pseudomonas fluorescens*: a potential food pest, challenges and advances in its detection // Ann. Microbiol. — 2019. — Vol. 69. — P. 873–883.
15. Madi A., Lakhdari O., Blottière H.M., Guyard-Nicodème M., Le Roux K., Groboillot A., Svinareff P., Doré J., Orange N., Feuilloley M.G., Connil N. The clinical *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces Interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway // BMC Microbiol. — 2010. — Vol. 10. — Art. 215. doi: 10.1186/1471-2180-10-215.
16. Mukhtar S., & Ghori I. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of garlic, cinnamon and turmeric against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* DSM 3256 // International Journal of Applied Biology and P. — 2012. — Vol. 3. — P. 131–136.
17. Orhan I.E., Ozcelik B., Kan Y., Kartal M. Inhibitory effects of various essential oils and individual components against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) produced by *Klebsiella pneumoniae* and their chemical compositions // J. Food Sci. — 2011. — Vol. 76. — No. 8. — P. 538–546.
18. Palleroni N.J. The *Pseudomonas* story // Environ. Microbiol. — 2010. — Vol. 12(6). — P. 1377–1383.
19. Pereira I., Severino P., Santos A.C., Silva A.M., and Souto E.B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems // Coll. Surf. B Biointerf. — 2018. — Vol. 171. — P. 566–578.
20. Quintieri L., Fanelli F., Caputo L. Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. spoilers in fresh dairy products: An underesti-

- mated risk and the control strategies // *Foods*. – 2019. – Vol. 8(9). – Art. 372. doi: 10.3390/foods8090372.
21. Stoeckel M., Lidolt M., Achberger V., Glück C., Krewinkel M., Stressler T., Von-Neubeck M., Wenning M., Scherer S., Fischer L., Hinrichs J. Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life // *Int. Dairy J.* – 2016. – Vol. 59. – P. 20–28.
  22. Takeoka G.R., Rodrigez D.M., Dao L., Patterson R. Head-space volatiles of *Scutellaria baicalensis* flowers // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. – 2009. – Vol. 12. – No. 4. – P. 435–442.
  23. Vithanage N.R., Dissanayake M., Bolge G., Palombo E.A., Yeager T.R., Datta N. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential // *Int. Dairy J.* – 2016. – Vol. 57. – P. 80–90.
  24. Zahraa G., Khadijeha B., Hosseinb D., Ali S. Essential oil composition of two *Scutellaria* species from Iran // *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. – 2019. – Vol. 6. – Issue 3. – P. 244–253.
  9. Faleiro ML. The mode of antibacterial action of essential oils / In: *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*. A. Méndez-Vilas ed. Portugal: University of Algarve, 2011:1143–1156.
  10. Fratianni F, De Martino L, Melone A, De Feo V, Coppola R, and Nazzaro F. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *J Food Sci* 2010; 75:M528–M535. doi: 0.1111/j.1750-3841.2010.01791.x.
  11. Guo F, Chen Q, Liang Q, Zhang M, Chen W, Chen H, Yun Y, Zhong Q, Chen W. Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens*. *Front Microbiol* 2021; 12:562094. doi: 10.3389/fmicb.2021.562094.
  12. Herman A, Tambor K, and Herman A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Curr Microbiol* 2016; 72:165–172.
  13. Keskin D, Ekmekçi S. Investigation of the incidence of *Pseudomonas* sp. in foods. *Hacet J Biol Chem* 2007; 35(3):181–186.
  14. Kumar H, Franzetti L, Kaushal A et al. *Pseudomonas fluorescens*: a potential food pest, challenges and advances in its detection. *Ann Microbiol* 2019; 69:873–883.
  15. Madi A, Lakhdari O, Blottière HM, Guyard-Nicodème M, Le Roux K, Groboillot A, Svinareff P, Doré J, Orange N, Feuilleley MG, Connil N. The clinical *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 strain exerts a cytotoxic effect on epithelial intestinal cells and induces Interleukin-8 via the AP-1 signaling pathway. *BMC Microbiol* 2010; 10:215. doi: 10.1186/1471-2180-10-215.
  16. Mukhtar S, & Ghori I. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of garlic, cinnamon and turmeric against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* DSM 3256. *International Journal of Applied Biology and P* 2012; 3:131–136.
  17. Orhan IE, Ozcelik B, Kan Y, Kartal M. Inhibitory effects of various essential oils and individual components against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) produced by *Klebsiella pneumoniae* and their chemical compositions. *J Food Sci* 2011; 76(8):538–546.
  18. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol* 2010; 12(6):1377–1383.
  19. Pereira I, Severino P, Santos AC, Silva AM, and Souto EB. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. *Coll Surf B Biointerf* 2018; 171:566–578.
  20. Quintieri L, Fanelli F, Caputo L. Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. spoilers in fresh dairy products: An underestimated risk and the control strategies. *Foods* 2019; 8(9):372. doi: 10.3390/foods8090372.
  21. Stoeckel M, Lidolt M, Achberger V, Glück C, Krewinkel M, Stressler T, Von-Neubeck M, Wenning M, Scherer S, Fischer L, Hinrichs J. Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: impact of residual heat-stable enzyme activity on

## References

1. Krotova IV, Yefremov AA. Issledovaniye khimicheskogo sostava plodov limonnika kitayskogo. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* 1999; 4:131–133 (in Russian).
2. Yatsenko YeS, Shirmanov MV, Yevdokimov IYu, Boyko SS, Durnikin DA. Pitatel'naya sreda dlya kul'tivirovaniya *Pseudomonas fluorescens* AR-33. Patent na izobreteniyе RU 2678133 C1, 23.01.2019 (in Russian).
3. Aprotosoae AC, Hăncianu M, Costache I-I, and Miron A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flav Fragran J* 2014; 29:193–219.
4. Baruzzi F, Lagonigro R, Quintieri L, Morea M, Caputo L. Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiol* 2012; 30(1):37–44.
5. Bisht SS, Ramani Priya K, Mishra R, Panda AK, Praveen B. Antimicrobial properties of few plants used in traditional system of medicine. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy* 2012; 3(4):563–564.
6. Brenes A, and Roura E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim Feed Sci Technol* 2010; 158:1–14. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007.
7. Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, and Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems – a review. *Food Control* 2015; 54:111–119.
8. Decimo M, Morandi S, Silveti T, Brasca M. Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *J Food Sci* 2014; 79(10):M2081–M2090.

- stability of UHT milk during shelf-life. *Int Dairy J* 2016; 59:20–28.
22. Takeoka GR, Rodrigez DM, Dao L, Patterson R. Headspace volatiles of *Scutellaria baicalensis* flowers. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2009; 12(4):435–442.
23. Vithanage NR, Dissanayake M, Bolge G, Palombo EA, Yeager TR, Datta N. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *Int Dairy J* 2016; 57:80–90.
24. Zahraa G, Khadijeha B, Hosseinb D, Ali S. Essential oil composition of two *Scutellaria* species from Iran. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences* 2019; 6(3):244–253.

## PLANTS – INHIBITORS OF BACTERIA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

E.S. YATSENKO, E.A. LEITES, V.A. PETUKHOV, A.A. PETUKHOV,  
A.V. ERMAKOVA, Yu.A. POTAPKINA, S.I. KRASNIKOVA

*Altai State University, Altai branch of the Central Scientific and Methodological Veterinary Laboratory, Barnaul*

The article presents the results of a study of the inhibitory activity of plants against the bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* A-33. Centaury, ginseng (root), papaya, skullcap, and especially lemongrass (fruit) have been shown to be the most effective inhibitors. The reason for the effects of herbal supplements on *Pseudomonas fluorescens* is probably mainly essential oils and flavonoids.

*Keywords:* *Pseudomonas fluorescens*, inhibitor plants, antibacterial properties, lemongrass, ginseng, papaya, skullcap.

### Address:

Leites E.A., Ph.D.

Associate professor of the department of technosphere safety and analytical chemistry, Altai State University, Barnaul

E-mail: leites-elena@yandex.ru

### Для цитирования:

Яценко Е.С., Лейтес Е.А., Петухов В.А., Петухов А.А., Ермакова А.В., Потапкина Ю.А., Красникова С.И. Растения – ингибиторы бактерий *Pseudomonas fluorescens*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):51–56.

### For citation:

Yatsenko E.S., Leites E.A., Petukhov V.A., Petukhov A.A., Ermakova A.V., Potapkina Yu.A., Krasnikova S.I. Plants – inhibitors of bacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(3):51–56 (in Russian).



## ПОЛУЧЕНИЕ СУБСТАНЦИИ ИМБРИЦИНА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *STREPTOMYCES IMBRICATUS*

Н.В. КОТОВА\*, И.А. КРАСОВИЦКАЯ, А.В. ГУСЕВ, Д.Р. ЗАЙРЕТДИНОВА

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

Разработана схема выделения и очистки антибиотика немедицинского назначения имбрицина. Показано, что при использовании в качестве экстрагента водного раствора изопропилового спирта с добавлением хлористого цинка и предварительном подсушивании мицелиальной массы *Streptomyces imbricatus* выход на стадии экстракции повышается. Получена субстанция имбрицина с удельной активностью  $854,8 \pm 31,2$  мкг/мг. Стабильность, высокая биологическая активность, широкий спектр противогрибкового действия, низкая токсичность и возможности применения в сельском хозяйстве, пищевой и целлюлозно-бумажной промышленности свидетельствуют о перспективности разработки технологии выделения и очистки имбрицина.

**Ключевые слова:** неполиеновые антибиотики, антибиотики немедицинского назначения, имбрицин, *Streptomyces imbricatus*, экстрагирование.

### Введение

Обеспечение населения качественными продуктами питания растительного происхождения является важнейшей задачей агропромышленного комплекса РФ. Одним из значимых направлений в растениеводстве является разработка новых средств защиты растений от фитопатогенной микрофлоры. Применение с этой целью препаратов, полученных химическим синтезом, зачастую оказывает неблагоприятное воздействие на экосистемы: ядохимикаты попадают в почву и воду, отравляют полезные виды птиц и рыб, оказывают вредное воздействие на человека. В качестве альтернативы химически синтезированным препаратам в настоящее время широко распространено применение антибиотиков немедицинского назначения. Такие антибиотики практически безвредны для растений и животных и обладают избирательностью действия в отношении фитопатогенных микроорганизмов [6]. Кроме того, перспективным с точки зрения экологии направлением является применение антибиотиков немедицинского назначения в качестве биоцидов для борьбы с микопаразитами бумаги [10]; возможно их использование

в качестве консервантов в пищевой промышленности [7–9]. Одним из таких препаратов является антибиотик имбрицин.

Имбрицин — противогрибковый неполиеновый макролидный антибиотик, синтезируемый актиномицетом *Streptomyces imbricatus* [1]. Характерными особенностями имбрицина являются стабильность, высокая биологическая активность, широкий спектр противогрибкового действия, нелетучесть, низкая токсичность, а также легкая и быстрая деградация до нетоксичных соединений, практически не оставляющих ядовитых остатков в окружающей среде [4]. Имбрицин оказывает фунгицидное действие в отношении ряда фитопатогенных грибов [1, 12], гербицидное действие на некоторые виды сорных растений [1], а также стимулирует защитные функции и выступает одним из регуляторов роста сельскохозяйственных культур. Описанные свойства имбрицина и потенциальные возможности его практического применения свидетельствуют о перспективности разработки технологии производства данного антибиотика, одной из важнейших стадий которой является выделение имбрицина из культуральной жидкости.

Цель работы — разработка технологии выделения имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*. Данная работа является продолжением исследования, результаты которого были опубликованы в 2021 году [2]. В задачи данной работы входят подбор условий проведения процесса экстракции имбрицина (состава экстрагента и влажности мицелия, поступающего на стадию экстракции), а также осуществление процес-

© 2022 г. Котова Н.В., Красовицкая И.А., Гусев А.В., Зайретдинова Д.Р.

\* Автор для переписки:

Котова Наталья Владимировна

к.х.н., доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО СПХФУ

E-mail: natalia.kotova@pharminnotech.com

сов упаривания экстракта, кристаллизации и сушки для получения субстанции имбрицина.

## Материалы и методы

Для получения имбрицина использовали штамм *Streptomyces imbricatus* ЛИА-0112, полученный из музея культур микроорганизмов кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО СПХФУ. Предварительно подготовленный посевной материал вносили в оптимизированную питательную среду № 135: кукурузная мука — 40 г/л, соевая мука — 20 г/л, глюкоза — 50 г/л, рН=7,2–7,4, объем среды — 30 мл. Ферментацию проводили в колбах объемом 750 мл, установленных на качалочную платформу, при частоте оборотов 200–220 мин<sup>-1</sup> в течение 4 суток (96 ч) и температуре 26–28 °С.

По окончании процесса культивирования осуществляли фильтрацию культуральной жидкости на нутч-филт্রে, состоящем из вакуумного насоса Microsart (Sartorius), колбы Бунзена и воронки Бюхнера. Мицелиальную массу подсушивали в сухожаровом шкафу BINDER при температуре 30 °С в течение 1, 2, 3, 4 и 5 часов, получая образцы мицелия с различными значениями остаточной влажности в зависимости от времени сушки.

Имбрицин выделяли из мицелия методом экстрагирования. В качестве экстрагентов использовали водные растворы этилового и изопропилового спиртов в концентрациях 50, 65, 80, 100%, а также 65%-ный водный раствор изопропилового спирта с добавлением 1%-ного водного раствора хлористого цинка и 65%-ный водный раствор изопропилового спирта с добавлением 1%-ного водного раствора CaCl<sub>2</sub>. Соотношение объемов фаз экстрагента и мицелия составляло 1:3, продолжительность процесса экстракции — 30 мин, температура процесса — 20–22 °С. В экстрактах определяли содержание (активность) имбрицина, рассчитывали выход на стадии.

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

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

Содержание (активность, А, мкг/мл) имбрицина в экстрактах и концентрате определяли по методу, описанному в [3], включающему определение оптической плотности раствора, содержащего имбрицин, на спектрофотометре

СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр») при длинах волн 240 и 270 нм. В качестве раствора сравнения использовали 96%-ный этиловый спирт. Удельную активность нистатина в субстанции определяли химическим (спектрофотометрическим) и биологическим методами [3, 5].

Для каждой стадии процесса получения субстанции рассчитывали выходы целевого продукта, определяли общий выход имбрицина по предлагаемой технологии.

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

## Результаты и обсуждение

В работе [2] был предложен метод выделения и очистки имбрицина, состоящий из следующих стадий:

1. Фильтрация культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*.
2. Экстрагирование имбрицина из мицелия продуцента.
3. Упаривание экстракта под вакуумом.
4. Кристаллизация имбрицина.
5. Сушка кристаллов имбрицина.

Показано, что в процессе культивирования *Streptomyces imbricatus* имбрицин накапливается преимущественно в мицелии. Были подобраны оптимальное соотношение объемов фаз мицелия и экстрагента (1:3) и продолжительность процесса экстракции (30 мин).

В качестве экстрагентов для выделения имбрицина из мицелия были выбраны этиловый и изопропиловый спирты различных концентраций. Для экстракции антибиотиков из мицелия продуцентов также широко распространено применение диметилформамида (ДМФА) и ацетона, однако использование этих экстрагентов в данном случае невозможно. Это обусловлено тем, что они обладают свойствами, не позволяющими определять содержание имбрицина в экстракте спектрофотометрическим методом: граница пропускания ДМФА — 260 нм, ацетона — 320 нм [11], тогда как для определения концентрации имбрицина необходимо проводить измерение оптической плотности раствора при 240 и 270 нм.

Результаты исследований представлены на рисунке 1.

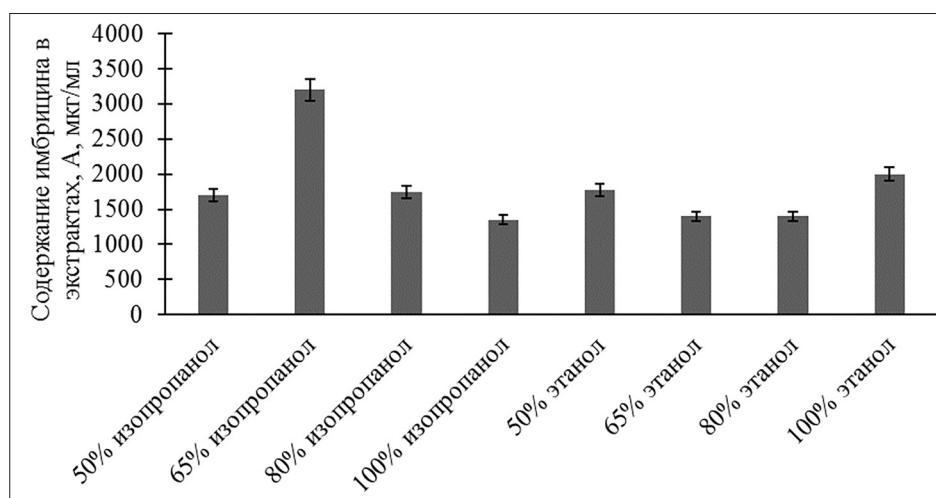


Рис. 1. Зависимость содержания имбрицина в экстракте от концентрации экстрагента

Из рисунка 1 видно, что наиболее эффективным экстрагентом является 65%-ный раствор изопропилового спирта ( $A=3224 \pm 157$  мкг/мл).

С целью повышения выхода на стадии экстракции изучено влияние на этот процесс таких факторов, как влажность поступающего на стадию мицелия и добавление солей в состав экстрагента.

Для определения зависимости активности имбрицина в экстракте от влажности мицелия *Streptomyces imbricatus* проводили подсушивание мицелия после стадии фильтрации. В зависимости от времени подсушивания получали следующие значения остаточной влажности: 73, 67, 65, 60, 54%. Результаты проведения процесса экстракции представлены на рисунке 2.

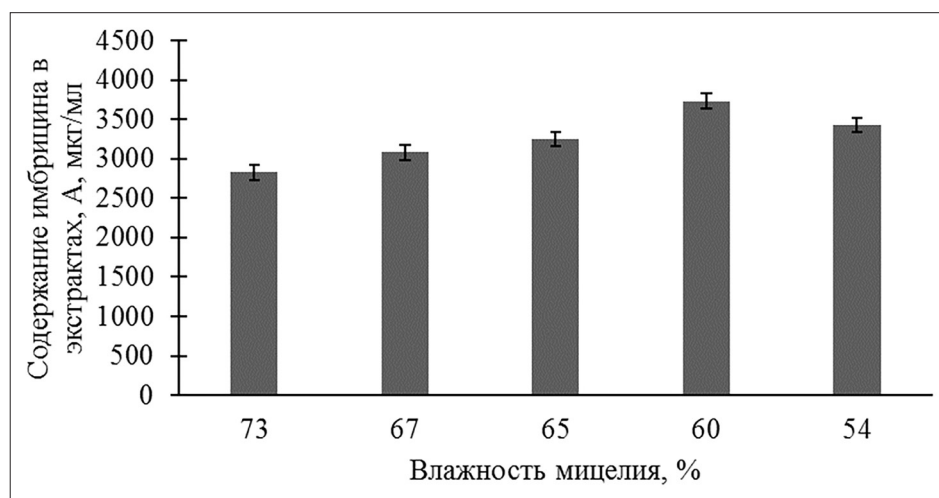


Рис. 2. Зависимость активности имбрицина в экстракте от влажности мицелия продуцента

В соответствии с полученными результатами можно сделать вывод, что подсушивание мицелия перед экстракцией способствует повышению активности антибиотика в экстракте. Наибольшее значение активности наблюдается при влажности мицелия, равной 60%, что соответствует продолжительности сушки 4 часа ( $A=3731 \pm 95$  мкг/мл). Дальнейшее увеличение продолжительности сушки приводит к снижению активности антибиотика в связи с его термолабильностью. При остаточной влажности мицелия 60% выход на

стадии экстракции увеличивается на 15,72% по сравнению с экстракцией 65%-ным водным раствором изопропилового спирта из мицелия, предварительно не подсушенного.

Рассмотрено влияние добавления к 65%-ному водному раствору изопропилового спирта 1%-ных водных растворов хлористого цинка ( $ZnCl_2$ ) и хлористого кальция ( $CaCl_2$ ) на процесс экстракции имбрицина из мицелия с остаточной влажностью 60%. Результаты приведены на рисунке 3.

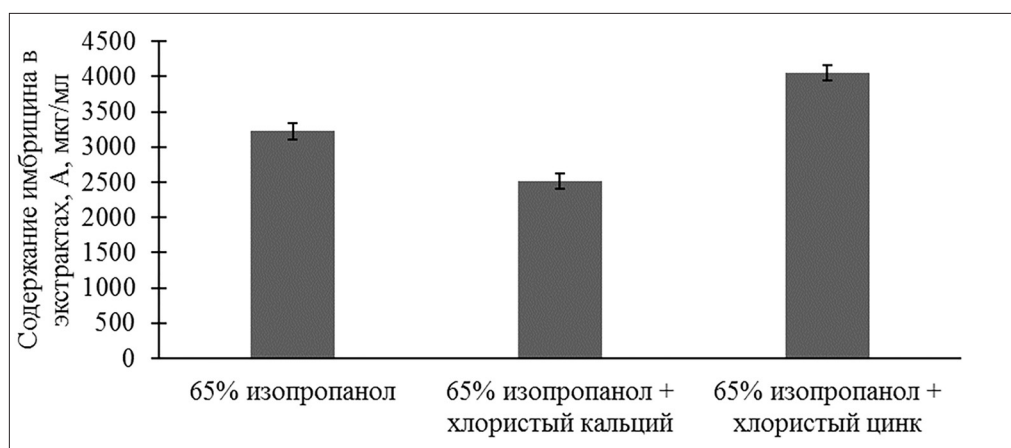


Рис. 3. Содержание имбрицина в экстракте в зависимости от состава экстрагента

Показано, что при добавлении хлористого кальция в экстрагент увеличение выхода целевого продукта не происходит. Добавление в 65%-ный изопропиловый спирт хлористого цинка увеличивает выход антибиотика на стадии экстракции на 10,03% ( $A=4054 \pm 112$  мкг/мл). В связи с этим данный экстрагент был отобран для проведения процесса экстракции.

Экстракт упаривали в 2,5–3 раза ( $A=10135 \pm 384$  мкг/мл), после чего проводили кристаллизацию имбрицина и сушку осадка. Было получено несколько партий субстанции антибиотика, представлявшей собой порошок, состоящий из мелких и крупных частиц от светло-бежевого до темно-коричневого цвета. В каждой из партий была определена удельная активность двумя методами (химическим и биологическим). Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

#### Удельная активность различных партий субстанции имбрицина

Номер партии	Удельная активность $\gamma$ , мкг/мг	
	Химический метод	Биологический метод
1	$892,2 \pm 21,2$	$873,1 \pm 28,2$
2	$866,3 \pm 16,1$	$841,3 \pm 30,2$
3	$883,1 \pm 25,2$	$850,1 \pm 35,1$

Согласно данным, приведенным в таблице 1, средняя удельная активность получаемой субстанции имбрицина составляет:

- при химическом методе определения:  $\gamma=880,5 \pm 20,8$  мкг/мг;
- при биологическом методе определения:  $\gamma=854,8 \pm 31,2$  мкг/мг.

Так как более достоверным является биологический метод определения, удельная активность субстанции имбрицина принимается равной  $854,8 \pm 31,2$  мкг/мг.

В таблице 2 представлены выходы целевого продукта по стадиям предлагаемой технологии. Приведены сводные данные по всем стадиям, описанным в данной работе и в работе [2].

Таблица 2

#### Выходы имбрицина по стадиям

№ п/п	Стадия процесса	Выход, %
1	Фильтрация культуральной жидкости <i>Streptomyces imbricatus</i>	69,17
2	Экстрагирование имбрицина из мицелия продуцента	94,61
3	Упаривание экстракта под вакуумом	68,25
4	Кристаллизация имбрицина	69,78
5	Сушка кристаллов имбрицина	98,93
	Общий выход	30,83

#### Заключение

В результате проведенной работы сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что выход на стадии экстракции имбрицина из мицелия *Streptomyces imbricatus* повышается при использовании в качестве экстрагента 65%-ного водного раствора изопропилового спирта с добавлением 1%-ного водного раствора хлористого цинка. Также для повышения выхода на стадии целесообразно подсушивание мицелиальной массы перед проведением процесса экстракции до остаточной влажности 60%.

2. Получена субстанция имбрицина с удельной активностью  $854,8 \pm 31,2$  мкг/мг.

3. Разработан метод выделения и очистки имбрицина, состоящий из следующих стадий: фильтра-

ция культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*; экстрагирование имбрицина из мицелия продуцента; упаривание экстракта под вакуумом; кристаллизация имбрицина; сушка кристаллов имбрицина. Рассчитаны выходы по стадиям технологического процесса. Общий выход целевого продукта по предлагаемой технологии составил 30,83%.

## Литература

1. *Белахов В.В., Яковлева Е.П., Колодязная В.А., Бойкова И.В.* Противогрибковый антибиотик немедицинского назначения имбрицин: получение, физико-химические свойства, структурные особенности и применение в промышленности и сельском хозяйстве: обзор // *Экологическая химия*. — 2017. — Т. 26. — № 5. — С. 233–248.
2. *Красовицкая И.А., Котова Н.В., Гусев А.В.* Разработка технологии выделения имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus* // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. — 2021. — Т. 17. — № 3. — С. 31–36.
3. *Малков М.А., Полатовская О.Г.* Лабораторный регламент № 270 на производство имбрицина. — Л.: ВНИТИАФ, 1989. — 128 с.
4. *Медведева Н.Г., Гриднева Ю.А., Сухаревич М.Э. [и др.].* Влияние имбрицина на рост и физиологические признаки целлюлозоразрушающих микромицетов // *Микология и фитопатология*. — 1996. — Т. 30. — № 3. — С. 43–47.
5. *Общая фармакопейная статья «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар»:* ОФС.1.2.4.0010.18. // XIV Государственная фармакопея Российской Федерации. — Москва, 2018. — Т. 1. — С. 1272–1304. — URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0010-15-opredelenie-antimikrobnoy-aktivnosti-antibiotikov-metodom-diffuzii-v-agar/> (дата обращения: 1.06.2020).
6. *Павловская Н.Е., Сидоренко В.С., Костромичёва Е.В.* Супероксиддисмутазная активность как тест-система для выявления физиологического действия гордецина // *Вестник ОрелГАУ*. — 2011. — № 2(29). — С. 12–14.
7. Патент № 2007924 Российская Федерация. МПК А23С 19/16. Защитный состав для покрытия сыра: № 4939230/13: заявл. 24.05.1991: опубл. 28.02.1994 / Снежко А.Г., Борисова З.С., Роздов И.А. [и др.]; заявитель Московский институт прикладной биотехнологии. — 9 с. — URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/64/75/a8/c962d45e1433ac/RU2007924C1.pdf> (дата обращения: 29.05.2020).
8. Патент № 2170025 Российская Федерация. МПК А23С 19/16, А23В 4/02. Состав для защиты поверхности сыра и способ ее защиты: № 99126802/13: заявл. 27.12.1999: опубл. 10.07.2001 / Снежко А.Г., Кузнецова Л.С., Борисова З.С. Холодова А.П.; заявитель Снежко А.Г.,

Кузнецова Л.С., Борисова З.С. Холодова А.П. — 5 с. — URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a1/b0/81/5758ea1bfb5b54/RU2170025C1.pdf> (дата обращения: 29.05.2020).

9. Патент № 2403794 Российская Федерация. МПК А23С 19/16 (2006.01). Состав для защиты поверхности сыра от плесневения: № 2009100136/10: заявл. 12.01.2009: опубл. 20.07.2010 / Феофилова Е.П., Галанина Л.А., Сергеева Я.Э. [и др.]; заявитель Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. — 6 с. — URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/32/fe/c1/edb904e646707f/RU2403794C2.pdf> (дата обращения: 29.05.2020).
10. *Сухаревич В.И., Кузикова И.Л., Медведева Н.Г.* Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. — Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб, 2009. — 207 с.
11. *Товбис М.С.* Методы анализа и идентификации органических соединений: описание практических работ для аспирантов направления 04.06.01 «Химические науки» направленности «Органическая химия», очной и заочной форм обучения. — Красноярск: СибГУ им. М.Ф. Решетнева, 2019. — 35 с. URL: <https://sibsau.ru/sveden/edufiles/172665/> (2.06.2020).
12. *Шенин Ю.Д., Белахов В.В., Рожкова Н.Г.* Фунгицидная активность имбрицина и его солей // *Антибиотики и химиотерапия*. — 1996. — Т. 41. — № 6. — С. 21–24.

## References

1. Belakhov VV, Yakovleva YeP, Kolodyaznaya VA, Boykova IV. Protivogribovyy antibiotik nemeditsinskogo naznacheniya imbritsin: polucheniye, fiziko-khimicheskiye svoystva, strukturnyye osobennosti i primeneniye v promyshlennosti i sel'skom khozyaystve: obzor. *Ekologicheskaya khimiya* 2017; 26(5):233–248 (in Russian).
2. Krasovitskaya IA, Kotova NV, Gusev AV. Razrabotka tekhnologii vydeleniya imbritsina iz kul'tural'noy zhidkosti *Streptomyces imbricatus*. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova* 2021; 17(3):31–36 (in Russian).
3. Malkov MA, Polatovskaya OG. Laboratornyy reglament № 270 na proizvodstvo imbritsina. Leningrad: VNITIAF, 1989: 128 (in Russian).
4. Medvedeva NG, Gridneva YuA, Sukharevich ME [i dr.]. Vliyaniye imbritsina na rost i fiziologicheskkiye priznaki tsellyulozorazrushayushchikh mikromitsetov. *Mikologiya i fitopatologiya* 1996; 30(3):43–47 (in Russian).
5. Obshchaya farmakopeynaya stat'ya «Opredeleniye antimikrobnoy aktivnosti antibiotikov metodom diffuzii v agar»: OFS.1.2.4.0010.18. XIV Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. Moscow, 2018; 1:1272–1304. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0010-15-opredelenie-antimikrobnoy-aktivnosti-antibiotikov-metodom-diffuzii-v-agar/> (data obrashcheniya: 1.06.2020) (in Russian).

6. Pavlovskaya NYe, Sidorenko VS, Kostromichova YeV. Superoksiddismutaznaya aktivnost' kak test-sistema dlya vyyavleniya fiziologicheskogo deystviya gordetsina. Vestnik OrelGAU 2011(2):12–14 (in Russian).
7. Patent № 2007924 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A23S 19/16. Zashchitnyy sostav dlya pokrytiya syra: № 4939230/13: zayavl. 24.05.1991: opubl 28.02.1994 / Snezhko AG, Borisova ZS, Rozdov IA [i dr]; zayavitel' Moskovskiy institut prikladnoy biotekhnologii. 9 s. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/64/75/a8/c962d45e1433ac/RU2007924C1.pdf> (data obrashcheniya: 29.05.2020) (in Russian).
8. Patent № 2170025 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A23C 19/16, A23V 4/02. Sostav dlya zashchity poverkhnosti syra i sposob yeye zashchity: № 99126802/13: zayavl. 27.12.1999: opubl 10.07.2001 / Snezhko A.G., Kuznetsova L.S., Borisova Z.S. Kholodova AP; zayavitel' Snezhko AG, Kuznetsova LS, Borisova ZS Kholodova AP. 5 s. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a1/b0/81/5758ea1bfb5b54/RU2170025C1.pdf> (data obrashcheniya: 29.05.2020). (in Russian).
9. Patent № 2403794 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A23C 19/16 (2006.01). Sostav dlya zashchity poverkhnosti syra ot plesneveniya: № 2009100136/10: zayavl 12.01.2009: opubl. 20.07.2010 / Feofilova YeP, Galanina LA, Sergeyeva YAE [i dr]; zayavitel' Institut mikrobiologii im SN Vinogradskogo RAN. 6 s. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/32/fe/c1/edb904e646707f/RU2403794C2.pdf> (data obrashcheniya: 29.05.2020) (in Russian).
10. Sukharevich VI, Kuzikova IL, Medvedeva NG. Zashchita ot biopovrezhdeniy, vyzyvayemykh gribami. Sankt-Peterburg: ELBI-St. Petersburg, 2009: 207 (in Russian).
11. Tovbis MS. Metody analiza i identifikatsii organicheskikh soyedineniy: opisaniye prakticheskikh rabot dlya aspirantov napravleniya 04.06.01 «Khimicheskkiye nauki» napravlenosti «Organicheskaya khimiya», ochnoy i zaочноy form obucheniya. Krasnoyarsk: SibGU im. M.F. Reshetneva, 2019: 35. URL: <https://sibsau.ru/sveden/edufiles/172665/> (2.06.2020) (in Russian).
12. Shenin YuD, Belakhov VV, Rozhkova NG. Fungitsidnaya aktivnost' imbritsina i yego soley. Antibiotiki i khimioterapiya 1996; 41(6):21–24 (in Russian).

## OBTAINING THE IMBRICIN SUBSTANCE FROM THE CULTURE LIQUID OF *STREPTOMYCES IMBRICATUS*

N.V. KOTOVA, I.A. KRASOVITSKAYA, A.V. GUSEV, D.R. ZAYRETDINOVA

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

The isolation and purification of the non-medical antibiotic imbricin scheme has been developed. It has been shown that when an aqueous solution of isopropyl alcohol with the addition of zinc chloride is used as an extractant and the mycelial mass of *Streptomyces imbricatus* is preliminarily dried, the yield at the extraction stage increases. The substance of imbricin with a specific activity of  $854.8 \pm 31.2$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  was obtained. Stability, high biological activity, a wide spectrum of antifungal activity, low toxicity and wide application possibilities in agriculture, food and pulp and paper industries indicate that the development of the imbricin isolating and purifying technology is promising.

*Keywords:* non-polyene antibiotics, non-medical antibiotics, imbricin, *Streptomyces imbricatus*, extraction.

### Address:

Kotova Natalia Vladimirovna, Ph.D.  
Associate Professor of the Department of Biotechnology,  
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education  
E-mail: natalia.kotova@pharminnotech.com

### Для цитирования:

Котова Н.В., Красовицкая И.А., Гусев А.В., Зайретдинова Д.Р. Получение субстанции имбрицина из культуральной жидкости *Streptomyces imbricatus*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):57–62.

### For citation:

Kotova N.V., Krasovitskaya I.A., Gusev A.V., Zayretdinova D.R. Obtaining the imbricin substance from the culture liquid of *Streptomyces imbricatus*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):57–62 (in Russian).

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ *THYMUS SERPYLLUM* L., *THYMUS MARSHALLIANUS* WILLD. И *PIMPINELLA ANISUM* L. В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ УРОИНФЕКЦИЙ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

О.Г. ШАПОВАЛ<sup>\*</sup>, А.С. ШЕРЕМЕТЬЕВА<sup>1</sup>, Н.А. ДУРНОВА<sup>1</sup>, Н.К. МУХАМАДИЕВ<sup>2</sup>,  
Г.Т. РАББИМОВА<sup>3</sup>, М.Х. НАЗИРБЕКОВ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского»  
Минздрава России, Российская Федерация;

<sup>2</sup> Самаркандский государственный университет им. Ш. Рашидова,

<sup>3</sup> Самаркандский государственный медицинский университет,

<sup>4</sup> Научный центр по контролю качества и оборота ветеринарных лекарственных средств,  
кормовых добавок, Республика Узбекистан

Цель настоящего исследования заключалась в сравнительной оценке антибактериальной активности эфирных масел тимьянов *Thymus serpyllum* L., *Thymus marshallianus* Willd. и *Pimpinella anisum* L. в отношении штаммов уропатогенных грамотрицательных бактерий, выделенных от беременных женщин. Эфирные масла из травы *Thymus serpyllum*, *Thymus marshallianus* и *Pimpinella anisum* получали по методу Гинзберга. Анализ химического состава полученных масел осуществляли с помощью газового хроматографа — масс-спектрометра. Антимикробную активность эфирных масел (минимальные ингибирующие концентрации — МИК) определяли методом микроразведений в отношении 7 штаммов, включающих в себя виды *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*. В составе эфирного масла *Thymus marshallianus* и *Thymus serpyllum* наибольшие массовые доли приходятся на тимол и карвакрол — 38,4 и 43,9% соответственно; в эфирном масле *Pimpinella anisum* преобладающим компонентом является транс-анетол — 83%. С учетом химического состава эфирных масел тимьянов по преобладающему антимикробному компоненту (тимолу и его изомерам) МИК<sub>50</sub> масел *T. marshallianus* и *T. serpyllum* для опытных штаммов составили 1,59 и 1,49 мг/мл соответственно, по основному антимикробному веществу эфирного масла *P. anisum* МИК<sub>50</sub> — составила 162,93 мг/мл. Делается вывод, что эфирные масла тимьянов обладают большей антимикробной активностью в отношении опытных штаммов бактерий по сравнению с анисовым маслом, но не отличаются по таковой между собой.

**Ключевые слова:** эфирные масла, антимикробная активность, *Thymus serpyllum*, *Thymus marshallianus*, *Pimpinella anisum*.

### Введение

Эфирные масла растений активно изучаются как потенциальные природные антимикробные агенты. Одним из направлений практического применения эфирных масел растений является местная санация кожи и слизи-

стых оболочек как при непосредственной обработке, так и при аппликации содержащих в своем составе эфирные масла лекарственных препаратов, тканых и нетканых материалов. Это относится также к созданию упаковок, предупреждающих микробную порчу пищевых продуктов, и др. [1, 9, 13, 15]. Антимикробная активность эфирных масел обусловлена содержанием в их составе терпенов, терпеноидов, фенилпропаноидов [4, 21]. Наличие и массовая доля этих соединений в составе эфирных масел отличаются в зависимости от вида эфирномасличных растений, а в соответствии с ними может изменяться и антимикробная активность.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка антибактериальной активности эфирных масел тимьянов *Thymus serpyllum* L.,

© 2022 г. Шаповал О.Г., Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Мухамадиев Н.К., Раббимова Г.Т., Назирбеков М.Х.

\* Автор для переписки:

Шаповал Ольга Георгиевна

к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии  
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, Саратов,  
E-mail: ogshapoval@gmail.com

*Thymus marhsallianus* Willd. и *Pimpinella anisum* L. в отношении грамотрицательных условно патогенных бактерий — возбудителей уроинфекций у беременных женщин. Задачами исследования послужили получение эфирных масел из растительного сырья указанных видов, анализ химического состава полученных эфирных масел, получение и субкультивирование бактериальных штаммов, реализация метода микро-разведений для определения минимальных ингибирующих концентраций.

### Материалы и методы

Получение эфирного масла из травы *Thymus serpyllum*, *Thymus marhsallianus* и *Pimpinella anisum* проводили с помощью прибора для определения содержания эфирного масла по методу Гинзберга перегонкой с водяным паром согласно требованиям XIV издания Государственной Фармакопеи ОФС.1.5.3.0010.15 «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» методом 1. Измельченную траву (30 г) помещали в круглодонную колбу объемом 1000 мл, приливали 300 мл очищенной воды и закрывали резиновой пробкой с обратным холодильником. Колбу с содержимым нагревали на колбонагревателе и кипятили в течение двух часов. После окончания перегонки и охлаждения прибора до комнатной температуры полученное эфирное масло собирали из приемника в пробирку.

Анализ химического состава полученных масел осуществляли с помощью газового хроматографа — масс-спектрометра YL6900 GC-MS (Young Lin Instruments, Корея) с капиллярной колонкой HP-5 30 м × 0,32 мм с толщиной фазы 0,25 мкм при соблюдении следующих условий: изотермический режим (60 °С 3 мин) с повышением до 250 °С (нагрев со скоростью 15 °С/мин) и поддержание достигнутого режима в течение 3 мин. Частота потока газа гелия составил 1 мл/мин, коэффициент разделения — 1:100. Масс-спектрометрический анализ проведен при следующих параметрах работы масс-детектора: времени удержания — 3 мин., эмиссии — 50 мА, диапазоне сканирования — 30—350 а.е.м., скорости сканирования — 1600 а.е.м./с, температуре ионного источника — 230 °С, температуре трансфера — 280 °С, времени анализа — 21 мин. Идентификацию компонентов проводили на основе сравнения полученных масс-спектров с библиотекой масс-спектров NIST (National Institute of Standards and Technology, США) и по времени удерживания. Для ко-

личественного анализа использовали метод внутренней нормализации.

Антимикробную активность эфирных масел определяли в отношении 3 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* — одного стандартного (*P. aeruginosa* ATCC 27835) и двух клинических, 4 штаммов *Escherichia coli* — стандартного *E. coli* ATCC 25922 (M-17) и трех клинических. Все клинические штаммы выделены из мочи беременных женщин с воспалительными процессами в мочевыводящих путях. С этой целью использовали рекомендуемый Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (версия 2021-01) и описываемый ГОСТ Р ИСО 20776-1— 2010 метод микро-разведений в бульоне Мюллера — Хинтона (AmpliChem GmbH, Германия), на основе которого, согласно обзору литературы, проводится тестирование антимикробной активности не только антимикробных химиопрепаратов, но и эфирных масел [3, 5, 10, 13]. Микробная нагрузка составила  $5 \times 10^4$  КОЕ/100 мкл. Через 20 часов после культивирования для определения характера МИК (бактерицидного, бактериостатического) из всех опытных разведений эфирных масел без видимого роста осуществляли высев на мясопептонный агар (ГРМ-агар, Россия).

На основании полученных значений МИК рассчитывали бактерицидную МИК<sub>50</sub> с оценкой ее доверительного интервала с вероятностью 95%, используя формулу Кербера в программе Microsoft Excel пакета программ Microsoft Office 365.

### Результаты

В составе эфирного масла *Thymus marshallianus*, согласно данным газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, наибольшие массовые доли приходятся на тимол и карвакрол — 38,4%, циклогексен — 8,9%, g-терпинен — 7,6%, эндоборнеол — 5,3%. В составе эфирного масла *Thymus serpyllum* массовая доля тимола и его изомеров была равна — 43,9%. На следующих трех позициях в порядке убывания находятся эвкалиптол — 8,4%, бензен — 4,2%, кариофиллен — 2,9%. В эфирном масле *Pimpinella anisum* преобладающими компонентами являются транс-анетол — 83%,  $\gamma$ -химачален — 3,9%, метилхавикол и изовалерилизоевгенол — 1,3%.

Бактерицидные МИК эфирного масла *T. serpyllum* для всех семи штаммов обоих видов составили 7,8 мкл/мл, бактериостатические МИК (3,9 мкл/мл) установлены для двух штаммов — *E. coli* ATCC 25922 (M-17) и *P. aeruginosa* 8114 (табл. 1). МИК эфирного масла



*T. marshallianus* для всех штаммов были бактерицидными: они составили 3,9 для стандартных штаммов *P. aeruginosa* ATCC 27835, *E. coli* ATCC 25922 (М-17) и клинического штамма *P. aeruginosa* 7728, для остальных — 7,8 мкл/мл. Эфирное масло *Pimpinella anisum* проявило бактерицидную активность в минимальной концентрации 250 мкл/мл. Для одного клинического штамма *E. coli* эта МИК носила бактериостатический характер, бактерицидная активность составила 500 мкл/мл.

С учетом химического состава эфирных масел тимьянов по преобладающему антимикробному компоненту (тимолу и его изомерам) МИК<sub>50</sub> *T. marshallianus* и *T. serpyllum* для опытных штаммов составили 1,59 и 1,49 мг/мл при доверительных интервалах 1,21–2,09 и 1,13–1,97 мг/мл, соответственно. По основному антимикробному веществу эфирного масла *P. anisum* (анетолу) МИК<sub>50</sub> составила 162,93 мг/мл, а ее доверительный интервал — 123,59–214,72 мг/мл.

Таблица 1

**Результаты тестирования антибактериальной активности эфирных масел *Thymus serpyllum*, *Thymus marhsallianus* и *Pimpinella anisum* методом микроразведений**

Штамм	Разведения эфирных масел (мкл/мл) и наличие в них видимого роста опытных штаммов <sup>1</sup>										
	2 (500 мкл/мл)	4 (250 мкл/мл)	8 (125 мкл/мл)	16 (62,5 мкл/мл)	32 (31,3 мкл/мл)	64 (15,6 мкл/мл)	128 (7,8 мкл/мл)	256 (3,9 мкл/мл)	512 (1,9 мкл/мл)	1024 (0,98 мкл/мл)	2046 (0,49 мкл/мл)
	<i>Thymus serpyllum</i> L.										
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27835, <i>P. aeruginosa</i> 7728	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 8114	-	-	-	-	-	-	-	- <sup>2</sup>	+	+	+
	<i>Thymus marshallianus</i>										
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27835, <i>P. aeruginosa</i> 7728	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 8114	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Pimpinella anisum</i>										
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27835, <i>P. aeruginosa</i> 7728, <i>P. aeruginosa</i> 8114	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Thymus serpyllum</i>										
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (М-17)	-	-	-	-	-	-	-	- <sup>2</sup>	+	+	+
<i>E. coli</i> 2, <i>E. coli</i> 3, <i>E. coli</i> 4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Thymus marshallianus</i>										
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (М-17)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> 2, <i>E. coli</i> 3, <i>E. coli</i> 4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Pimpinella anisum</i>										
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (М-17), <i>E. coli</i> 2, <i>E. coli</i> 4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 3	-	- <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: <sup>1</sup>— знак «-» — отсутствие видимого роста; знак «+» — наличие видимого роста; <sup>2</sup> — бактериостатическая концентрация

## Обсуждение

Согласно анализу химического состава эфирных масел, основными антимикробными веществами тимьянов являются монотерпеновые фенолы (тимол, карвакрол), а также монотерпеновые углеводороды (терпинен), монотерпеновые спирты (борнеол), бициклические сесквитерпеновые углеводороды (кариофиллен). В эфирном масле *Pimpinella anisum* таковыми являются монотерпеновые фенилпропаноиды (анетол и метилхавикол), а также монотерпеновый фенол (эвгенол), что согласуется с данными литературы [4, 13–15, 20].

Полученные значения МИК эфирных масел тимьянов коррелируют с данными, приведенными другими авторами. Так, при оценке антимикробной активности эфирного масла *Thymus zygus* методом микроразведений получили МИК<sub>50</sub> в отношении уropатогенных штаммов *E. coli* в диапазоне 1,56–6,25 мг/мл [10]. МИК<sub>50</sub> *Thymus capitatus*, также определенные по результатам метода микроразведений, для штаммов *P. aeruginosa* составили 2,94 мг/мл, для *E. coli* — 0,73 мг/мл [14]. МИК<sub>50</sub> эфирных масел *Thymus vulgaris*, *T. serpyllum* в отношении штаммов псевдомонад, выделенных из рыбы, имели величины 6,25–50 мкл/мл [8]. Эфирные масла тимьянов в целом признаются как обладающие наиболее высокой антимикробной активностью [19].

Согласно значениям МИК анисового масла (162,93 мг/мл), его антимикробная активность в нашем случае оказалась значительно ниже, чем указано в литературе. По результатам ряда авторов, МИК анисового масла в отношении штаммов *E. coli* и *Salmonella typhimurium* составили 4,4 и 0,6 мг/мл [13], а МИК в составе пленок с анисовым маслом достигли для *E. coli* и *V. parahaemolyticus* порядка 90 мг/мл [15]. МИК анисового масла в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая использованные и нами виды, составила 2–3 мг/мл [2]. Следует отметить, что в анализированных источниках литературы экстрагированное в чистом виде анисовое масло не изучалось на предмет антимикробной активности. Использовались его нано- или микроэмульсии, или базовые растворы, содержащие сурфактанты [2, 5]. Антимикробная активность эфирных масел разных видов растений в последние годы изучается сразу в отношении их эмульсий, поскольку в их составе улучшается проникновение активных веществ в клеточную оболочку бактерий [3, 12, 16]. Действие компонентов эфирных масел на бактерии сводится к взаимодействию их гидрофобных частей с мембранными структурами бактериальной клетки, что нарушает

работу дыхательных ферментов, трансмембранный транспорт, приводит к внутриклеточному ацидозу [17, 19, 21]. Рядом авторов установлены изменения в морфологии бактериальных клеток *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas orientalis*, свидетельствующие о повреждении внешних оболочек эфирными маслами и их компонентами (тимолом, циннамальдегидом) — округление палочковидных клеток, деструкция клетки [6, 11]. Изменения в структуре клеточных оболочек бактерий отмечаются как под действием эфирных масел, так и специально приготовленных их микро- и наноэмульсий. В нашем случае использованы нативные экстрагированные эфирные масла.

Различия в антимикробной активности эфирных масел тимьянов и аниса могут быть обусловлены и различиями в химической структуре основных антимикробных веществ эфирных масел. Будучи липофильными соединениями, они хорошо взаимодействуют с мембранными фосфолипидами. При этом гидрофильные части молекул взаимодействуют с полярной частью мембраны, то есть с ее средним слоем — «хвостами» фосфолипидов, а гидрофобные ароматические кольца и боковые алифатические цепи погружаются в ее внутреннюю часть [9]. Кроме того, гидроксильные группы соединений эфирных масел могут участвовать в образовании водородных связей с активными центрами ферментов клеток и усиливать активность несущих их молекул в отношении грамотрицательных бактерий [7, 21]. В химической структуре основных компонентов эфирных масел тимьянов есть гидроксильные группы, но отсутствует разветвленная боковая цепь, как у многих фенилпропаноидов [18]. Это может способствовать лучшему проникновению молекулы в мембрану и взаимодействию с ферментами клетки.

## Заключение

На основании результатов осуществленного исследования можно сделать такие выводы:

- По основному антимикробному веществу эфирного масла *P. anisum* МИК<sub>50</sub> составила 162,93 мг/мл.
- С учетом химического состава эфирных масел тимьянов по преобладающему антимикробному компоненту (тимолу и его изомерам) МИК<sub>50</sub> масел *T. marshallianus* и *T. serpyllum* для опытных штаммов составили 1,59 и 1,49 мг/мл соответственно,
- Согласно полученным значениям МИК, эфирные масла тимьянов обладают большей антимикробной активностью в отношении опытных штаммов бактерий

по сравнению с анисовым маслом, но не отличаются по таковой между собой.

- Эфирные масла тимьянов являются перспективными антимикробными агентами для получения эмульсий с целью лечения инфекций в урологии, вызываемых *P. aeruginosa* и *E. coli*.

## Литература

1. Пономарева Е.И., Молохова Е.И., Холов А.К. Применение эфирных масел в фармации // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21156> (дата обращения: 01.07.2022).
2. Abdel-Reheem Mohammed A.T., Oraby M.M. Antimicrobial, cytotoxicity, and necrotic ripostes of *Pimpinella anisum* essential oil // Annals of Agricultural Sciences. — 2015. — Vol. 60. — No. 2. — P. 335–340.
3. Abu Ali O.A., El-Naggar M.E., Abdel-Aziz M.S., Saleh D.I., Abu-Saied M.A., El-Sayed W.A. Facile synthesis of natural anise-based nanoemulsions and their antimicrobial activity // Polymers. — 2021. — Vol. 13. — No. 12. — Art. 2009. doi: 10.3390/polym13122009.
4. Białon M., Krzysko-Lupicka T., Nowakowska-Bogdan E., Wieczorek P.P. Chemical composition of two different lavender essential oils and their effect on facial skin microbiota // Molecules. — 2019. — Vol. 24. — No. 18. — Art. 3270. doi:10.3390/molecules24183270.
5. Campana R., Tiboni M., Maggi F., Cappellacci L., Cianfaglione K., Morshedloo M.R., Frangipani E., Casertari L. Comparative analysis of the antimicrobial activity of essential oils and their formulated microemulsions against foodborne pathogens and spoilage bacteria // Antibiotics (Basel). — 2022. — Vol. 11. — No. 4. — Art. 447. doi: 10.3390/antibiotics11040447.
6. Gomez-Garcia M., Arguello H., Puente H., Mencia-Ares O., Gonzalez S., Miranda R., Rubio P., Carvajal A. In-depth in vitro evaluation of the activity and mechanisms of action of organic acids and essential oils against swine enteropathogenic bacteria // Frontiers in Veterinary Sciences. — 2020. — Vol. 7. — Art. 572947. doi: 10.3389/fvets.2020.572947.
7. Guimaraes A.C., Meireles L.M., Lemos M.F., Guimaraes M., Endringer D.C., Fronza M., Scherer R. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils // Molecules. — 2019. — Vol. 24. — No. 13. — Art. 2471. doi: 10.3390/molecules24132471.
8. Kacaniova M., Terentjeva M., Vukovic N., Puchalski C., Roychoudhury S., Kunova S., Kluga A., Tokar M., Kluz M., Ivanisova E. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish // Saudi Pharmaceutical Journal. — 2017. — Vol. 25. — No. 8. — P. 1108–1116.
9. Kowalczyk A., Przychodna M., Sopata S., Bodalska A., Fecka I. Thymol and thyme essential oil — new insights into selected therapeutic applications // Molecules. — 2020. — Vol. 25. — No. 18. — Art. 4125. doi: 10.3390/molecules25184125.
10. Lagha R., Ben Abdallah F., AL-Sarhan B.O., Al-Sodany Y. Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients // Molecules. — 2019. — Vol. 24. — No. 6. — Art. 1161. doi: 10.3390/molecules24061161.
11. Leja K., Szudera-Konczał K., Switala E., Juzwa W., Kowalczewski P.L., Czaczuk K. The influence of selected plant essential oils on morphological and physiological characteristics in *Pseudomonas orientalis* // Foods. — 2019. — Vol. 8. — No. 7. — Art. 277. doi: 10.3390/foods8070277
12. Lelis C.A., de Carvalho A., Conte Junior C.A. A systematic review on nanoencapsulation natural antimicrobials in foods: in vitro versus in situ evaluation, mechanisms of action and implications on physical-chemical quality // International Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol. 22. — No. 21. — Art. 12055. doi: 10.3390/ijms222112055.
13. Mahdavi V., Hosseini S.E., Sharifian A. Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger // Food science & Nutrition. — 2018. — Vol. 6. — No. 2. — P. 269–279. doi: 10.1002/fsn3.54.
14. Moumni S., Elaissi A., Trabelsi A., Merghni A., Chraief I., Jelassi B., Chemli R., Ferchichi S. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some *Lamiaceae* species essential oils from Tunisia // BMC Complementary Medicines and Therapies. — 2020. — Vol. 20. — Art. 103. doi: 10.1186/s12906-020-02888-6.
15. Noori N., Khanjari A., Rezaeigoolestani M., Karabagias I.K., Mokhtari S. Development of antibacterial biocomposites based on poly(lactic acid) with spice essential oil (*Pimpinella anisum*) for food applications // Polymers. — 2021. — Vol. 13. — No. 21. — Art. 3791. doi: 10.3390/polym13213791.
16. Pavoni L., Perinelli D.R., Bonacucina G., Cespi M., Palmieri G.F. An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: formulation, preparation and stability // Nanomaterials (Basel). — 2020. — Vol. 10. — No. 1. — Art. 135. doi: 10.3390/nano10010135.
17. Rua J., del Valle P., de Arriaga D., Fernandez-Alvarez L., Garcia-Armesto M.-R. Combination of carvacrol and thymol: antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity // Foodborne Pathogens and Diseases. — 2019. — Vol. 16. — No. 9. — P. 622–629.
18. Sadgrove N.J., Padilla-Gonzalez G.F., Phumthum M. Fundamental chemistry of essential oils and volatile organic compounds, methods of analysis and authentication // Plants (Basel). — 2022. — Vol. 11. — Issue 6. — Art. 789. doi: 10.3390/plants11060789.

19. Sakkas H., Papadopoulou C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils // Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2017. — Vol. 27. — No. 3. — P. 429–438.
20. Valdivieso-Ugarte M., Gomez-Llorente C., Plaza-Diaz J., Gil A. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: a systematic review // Nutrients. — 2019. — Vol.11. — No. 11. — Art. 2786. doi: 10.3390/nu11112786.
21. Winska K., Maczka W., Lyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? // Molecules. — 2019. — Vol. 24. — No. 11 — Art. 2130. doi: 10.3390/molecules24112130.
9. Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. Thymol and thyme essential oil — new insights into selected therapeutic applications. Molecules 2020; 25(18):4125. doi: 10.3390/molecules25184125.
10. Lagha R, Ben Abdallah F, AL-Sarhan BO, Al-Sodany Y. Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. Molecules 2019; 24(6):1161. doi: 10.3390/molecules24061161.
11. Leja K, Szudera-Konczal K, Switala E, Juzwa W, Kowalczewski PL, Czaczek K. The influence of selected plant essential oils on morphological and physiological characteristics in *Pseudomonas orientalis*. Foods 2019; 8(7):277. doi: 10.3390/foods8070277
12. Lelis CA, de Carvalho A, Conte Junior CA. A systematic review on nanoencapsulation natural antimicrobials in foods: in vitro versus in situ evaluation, mechanisms of action and implications on physical-chemical quality. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(21):12055. doi: 10.3390/ijms222112055.
13. Mahdavi V, Hosseini SE, Sharifian A. Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. Food science & Nutrition 2018; 6(2):269–279. doi: 10.1002/fsn3.54.
14. Moumni S, Elaissi A, Trabelsi A, Merghni A, Chraief I, Jelassi B, Chemli R, Ferchichi S. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some *Lamiaceae* species essential oils from Tunisia. BMC Complementary Medicines and Therapies 2020; 20:103. doi: 10.1186/s12906-020-02888-6.
15. Noori N, Khanjari A, Rezaeigolestani M, Karabagias IK, Mokhtari S. Development of antibacterial biocomposites based on poly(lactic acid) with spice essential oil (*Pimpinella anisum*) for food applications. Polymers 2021; 13(21):3791. doi: 10.3390/polym13213791.
16. Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF. An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: formulation, preparation and stability. Nanomaterials (Basel) 2020; 10(1):135. doi: 10.3390/nano10010135.
17. Rua J, del Valle P, de Arriaga D, Fernandez-Alvarez L, Garcia-Armesto M-R. Combination of carvacrol and thymol: antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. Foodborne Pathogens and Diseases 2019; 16(9):622–629.
18. Sadgrove NJ, Padilla-Gonzalez GF, Phumthum M. Fundamental chemistry of essential oils and volatile organic compounds, methods of analysis and authentication. Plants (Basel) 2022; 11(6):789. doi: 10.3390/plants11060789.

## References

1. Ponomareva YeI, Molokhova YeI, Kholov AK. Primeneniye efirnykh masel v farmatsii. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya 2015; 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=21156> (data obrashcheniya: 01.07.2022) (in Russian).
2. Abdel-Reheem Mohammed AT, Oraby MM. Antimicrobial, cytotoxicity, and necrotic ripostes of *Pimpinella anisum* essential oil. Annals of Agricultural Sciences 2015; 60(2):335–340.
3. Abu Ali OA, El-Naggar ME, Abdel-Aziz MS, Saleh DI, Abu-Saied MA, El-Sayed WA. Facile synthesis of natural anise-based nanoemulsions and their antimicrobial activity. Polymers 2021; 13(12):2009. doi: 10.3390/polym13122009.
4. Białon M, Krzysko-Lupicka T, Nowakowska-Bogdan E, Wieczorek PP. Chemical composition of two different lavender essential oils and their effect on facial skin microbiota. Molecules 2019; 24(18):3270. doi:10.3390/molecules24183270.
5. Campana R, Tiboni M, Maggi F, Cappellacci L, Cianfaglione K, Morshedloo MR, Frangipani E, Casettari L. Comparative analysis of the antimicrobial activity of essential oils and their formulated microemulsions against foodborne pathogens and spoilage bacteria. Antibiotics (Basel) 2022; 11(4):447. doi: 10.3390/antibiotics11040447.
6. Gomez-Garcia M, Arguello H, Puente H, Mencia-Ares O, Gonzalez S, Miranda R, Rubio P, Carvajal A. In-depth in vitro evaluation of the activity and mechanisms of action of organic acids and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. Frontiers in Veterinary Sciences 2020; 7:572947. doi: 10.3389/fvets.2020.572947.
7. Guimaraes AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimaraes M, Endringer DC, Fronza M, Scherer R. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. Molecules 2019; 24(13):2471. doi: 10.3390/molecules24132471.
8. Kacaniova M, Terentjeva M, Vukovic N, Puchalski C, Roychoudhury S, Kunova S, Kluga A, Tokar M, Kluz M, Ivanisova E. The antioxidant and antimicrobial activity of es-

20. Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Gil A. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: a systematic review. *Nutrients* 2019; – Vol.11(11):2786. doi: 10.3390/nu11112786.
21. Winska K, Maczka W, Lyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?. *Molecules* 2019; 24(11):2130. doi: 10.3390/molecules24112130.

## COMPARATIVE EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS OF *THYMUS SERPYLLUM* L., *THYMUS MARSHALLIANUS* WILLD. AND *PIMPINELLA ANISUM* L. AGAINST GRAM-NEGATIVE BACTERIA THAT CAUSE UROINFECTIONS IN PREGNANT WOMEN

O.G. SHAPOVAL<sup>1</sup>, A.S. SHEREMETYEVA<sup>1</sup>, N.A. DURNOVA<sup>1</sup>, N.K. MUKHAMADIEV<sup>2</sup>, G.T. RABBIMOVA<sup>3</sup>, M.Kh. NAZIRBEKOV<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky Ministry of Health of Russia, Russian Federation;*

<sup>2</sup> *Samarkand State University named after Sh. Rashidov,*

<sup>3</sup> *Samarkand State Medical University,*

<sup>4</sup> *Scientific Center for Quality Control and Circulation of Veterinary Medicines, Feed Additives, Republic of Uzbekistan*

The purpose of this study was to compare the antibacterial activity of thyme essential oils *Thymus serpyllum* L., *Thymus marshallianus* Willd. and *Pimpinella anisum* L. against strains of uropathogenic gram-negative bacteria isolated from pregnant women. Essential oils from the herb *Thymus serpyllum*, *Thymus marshallianus* and *Pimpinella anisum* were obtained using the Ginsberg method. Analysis of the chemical composition of the obtained oils was carried out using a gas chromatograph - mass spectrometer. The antimicrobial activity of essential oils (minimum inhibitory concentrations – MIC) was determined by microdilution against 7 strains, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* species. In the composition of the essential oil of *Thymus marshallianus* and *Thymus serpyllum*, thymol and carvacrol account for the largest mass fractions – 38.4 and 43.9%, respectively; in the essential oil of *Pimpinella anisum*, the predominant component is trans-anethole – 83%. Taking into account the chemical composition of thyme essential oils for the predominant antimicrobial component (thymol and its isomers), the MIC<sub>50</sub> of *T. marshallianus* and *T. serpyllum* oils for the experimental strains was 1.59 and 1.49 mg/ml, respectively, for the main antimicrobial substance of *P. anisum* MIC<sub>50</sub> was 162.93 mg/ml. It is concluded that thyme essential oils have a greater antimicrobial activity against experimental strains of bacteria compared to anise oil, but do not differ in that from each other.

*Keywords:* essential oils; antimicrobial activity; *Thymus serpyllum*; *Thymus marshallianus*; *Pimpinella anisum*.

### Address:

Shapoval O.G., Ph.D.

Associate professor of the department of microbiology, virology and immunology, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saratov

E-mail: ogshapoval@gmail.com

### Для цитирования:

Шаповал О.Г., Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Мухамадиев Н.К., Раббимова Г.Т., Назирбеков М.Х. Сравнительная оценка антибактериальной активности эфирных масел *Thymus serpyllum* L., *Thymus marshallianus* Willd. и *Pimpinella anisum* L. в отношении грамотрицательных бактерий – возбудителей уроинфекций у беременных женщин. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):63–69.

### For citation:

Shapoval O.G., Sheremetyeva A.S., Durnova N.A., Mukhamadiev N.K., G.T. Rabbimova, Nazirbekov M.Kh. Comparative evaluation of the antibacterial activity of the essential oils of *Thymus serpyllum* L., *Thymus marshallianus* Willd. and *Pimpinella anisum* L. against gram-negative bacteria that cause uroinfections in pregnant women. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(3):63–69 (in Russian).

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ В ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

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

Представлен обзор литературы по использованию бактериофагов в терапии и профилактике особо опасных инфекций. Подчеркивается значение недавнего обстоятельного изучения холерного фага и туляремиального бактериофага, а также поиска аналогичных оптимальных подходов в отношении сибирской язвы и чумы. В обзоре сочетается всесторонний исторический подход с актуализацией современных тенденций в теории и методологии фаготерапии и фагопрофилактики. В данном контексте авторы проводят: изучение фармакодинамики и фармакокинетики фагов в организме; поиск и выделение высоковирулентных фагов, обладающих широким спектром литической активности и высокой степенью репродуктивности и стабильности; определение наличия иммунных реакций организма на фаги и др.

*Ключевые слова:* бактериофаги, особо опасные инфекции, терапия, профилактика, преемственные задачи, обзоры.

Большую угрозу для мирового здравоохранения несет широкое распространение бактериальных патогенов, обладающих множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам. Бесконтрольное применения антибиотиков не только в медицине, но и в пищевой промышленности, животноводстве, сельском хозяйстве вызвало эту глобальную тенденцию роста полирезистентных штаммов [9]. Большую тревогу вызывает группа инфекционных заболеваний, отнесенных к особо опасным инфекциям (ООИ), и являющихся высокопотенциальными агентами биотерроризма, представляющими исключительную эпидемическую опасность. Учитывая ограниченный выбор эффективных антибиотиков, а также высокий риск развития побочных реакций на антибактериальные препараты, особенно при длительном приеме, актуальными являются поиск и изучение новых подходов в профилактике и лечении инфекционно-воспалительных заболеваний. В качестве одного из таких перспективных подходов рассматривается применение бактериофагов [18].

Бактериофагами называют вирусы, высокая специфичность которых позволяет не только лизировать, но и дифференцировать отдельные виды бактерий и штаммы

одного вида [10]. Этот метод широко используется в лабораторной практике для идентификации возбудителей таких особо опасных инфекций, как холера, сибирская язва, чума, бруцеллез и др. [15]. Изучалась также возможность применения фагов для профилактики и лечения этих заболеваний, что необходимо учитывать при создании новых терапевтических и профилактических препаратов на основе бактериофагов. В литературе зафиксированы противоречивые сведения о применении фаготерапии и фагопрофилактики особо опасных инфекций.

Перечень и меры профилактики распространения ООИ были закреплены в Международных медико-санитарных правилах (ММСП), принятых 22-й сессией Всемирной ассамблеи здравоохранения (ВОЗ) только с 26 июля 1969 года. Практическое применение бактериофагов для лечения и профилактики холеры началось уже с 1927 г. благодаря французскому микробиологу Ф. д'Эреллю. Во время холерных вспышек в Индии был успешно опробован метод по искусственному заражению колодцев холерными бактериофагами. В 1932 году исследователь J. Morison также доказал высокую эффективность бактериофагов в Индии: в своих исследованиях автор предоставил статистику смертности больных людей холерой, применявших препарат (10%) и отказавшихся от него (92,3%).

Одновременно с описанными событиями в Индии терапия и профилактика фагами развивались в то время и в СССР. Большая часть этих исследований описана в научных работах D. Myelnikov [39]. В Советском Союзе история применения фагопрофилактики и фаготерапии

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

\* **Автор для переписки:**

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

холеры началась с 1938 г. благодаря советским микробиологам Э.В. Ермольевой и Л.М. Якобсон. Наиболее эффективно холерные бактериофаги использовались по методу санации колодцев и профилактического приема бактериофагов [5]. Благодаря массовой профилактике поливалентными холерными бактериофагами удалось не допустить развития эпидемии холеры во время Великой Отечественной войны в осажденном Сталинграде. Итогом многолетнего использования и изучения холерного бактериофага стало включение Э.В. Ермольевой в свою монографию раздела «Фагопрофилактика и фаготерапия» [8].

После войны препарат для лечения и профилактики холеры на основе бактериофагов производился на базе противочумных институтов и исследовался экспериментально. Только в 1960-х годах А.Г. Никоновым с соавт. был разработан препарат холерных бактериофагов с повышенной литической активностью, эффективность которого была проверена и доказана при ликвидации вспышек в Восточном Пакистане и Афганистане. Методика заключалась в комплексном применении солевых растворов, антибиотиков и бактериофагов [16]. Позднее группе советских авторов удалось получить бактериофаги с литической активностью, превосходящей фаги А.Г. Никонова. Сотрудниками противочумного института «Микроб» была предпринята попытка по созданию двух препаратов, содержащих поливалентные холерные фаги к разным биоварам возбудителя холеры. Однако при проведении испытаний в Бангладеш на фоне регидратационной терапии терапевтического эффекта данных препаратов выявлено не было [16]. В дальнейшем были высказаны сомнения в отношении профилактического и лечебного применения холерных фагов, что послужило причиной прекращения исследований в данной области.

В 2000 г. сотрудниками Ростовского противочумного института возобновилось изучение возможности экспериментального применения бактериофагов для терапии и профилактики холеры [14]. В работе Т.А. Кудряковой [13] показана высокая эффективность сочетанного применения регидратационной терапии (глюкосалан), авторского штамма лактобацилл и фаготерапии при экспериментальной холере. В последние годы проводились исследования холерных бактериофагов в отношении антибиотикорезистентных штаммов холерных вибрионов Эль-Тор на модели *in vivo*, которые также показали эффективность фаготерапии и фагопрофилактики [24].

Аналогичные результаты эффективности фагопрофилактики и фаготерапии холеры были получены зарубежными исследователями Bhowmick T.S. (2009),

Jaiswal A. (2014), Yen M. (2017). На модели взрослых кроликов и белых мышей найдено, что применение фагов как до, так и после заражения снижало тяжесть проявления симптомов заболевания и признаков воспаления у зараженных животных [30, 37]. Также доказано, что применение коктейля из трех вирулентных фагов за сутки до заражения снижало колонизацию тонкой кишки и препятствовало развитию холероподобной диареи [47]. В 2019 г. исследования Bhandare S. et al. продемонстрировали в опытах *in vivo* при моделировании экспериментальной холеры, что пероральное введение даже одного фага семейства *Podoviridae* может предотвратить клинические симптомы холеры у новорожденных кроликов без развития устойчивости к фагам [29].

Помимо практического экспериментального применения фаговых препаратов, исследователи работают и над теоретической стороной бактериофагии. Такая работа [36] зарубежных авторов направлена на современное развитие использования новых подходов в терапии холеры пробиотиками и холерными бактериофагами, которые показали успех в лабораторных условиях, но еще не были использованы в популяциях людей. Авторы считают, что для борьбы с этой инфекцией необходима многосторонняя гибкая стратегия с учетом конкретных требований текущей вспышки. Комбинация существующих методов (пероральная регидратационная терапия, антибиотики, вакцинация, пробиотики и фаговая терапия) имеет значительный потенциал для дальнейшей борьбы с многовековым бедствием под названием «холера».

Не только холера является большой проблемой в системе обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, но и другие особо опасные инфекции требуют контроля и разработки дополнительных подходов к их профилактике и лечению. Одним из таких смертельных патогенов является *Francisella tularensis* [41]. По историческим сведениям, эту инфекцию сравнивали с чумой с более легким течением, что дает основание предположить, что ряд наблюдавшихся в прошлом доброкачественных эпидемий чумы был в действительности вспышками туляремии [3]. Большой опасностью, а также отличительной особенностью данного возбудителя является выживаемость в нейтрофилах и множественность механизмов передачи инфекции при практически 100%-ной восприимчивости человека [12].

Поиск туляремиальных бактериофагов долгие годы не давал положительных результатов. И только после многократных попыток удалось выделить несколько вирусов, обладающих узкой литической активностью в

отношении возбудителя туляремии [27]. Данные бактериофаги имеют в геноме гены интегразы, поэтому не могут быть использованы для профилактики и лечения этого заболевания. Впервые удалось выделить туляремиальный бактериофаг с широким спектром литической активности и разработать способ его получения в 2011 году [21]. Данный фаг был выделен из органов морской свинки, зараженной живой культурой вакцинного штамма № 15 линии НИИЭГ, который также является умеренным, так как имеет нитчатую структуру. Простота использования этого фага позволила рекомендовать его для идентификации возбудителя туляремии, выделяемого из организма больного или контаминированных объектов внешней среды, а также для изучения физиологических свойств и поверхностных структур штаммов возбудителя. Вопрос о возможности применения туляремиальных фагов для профилактики и лечения туляремии требует дальнейшего изучения и поиска вирулентных бактериофагов данного вида. Анализ обзорной работы И.А. Ципелевой с соавторами четко демонстрирует актуальность данной проблемы, так как терапия туляремии антибактериальными препаратами связана с определенными трудностями, которые могут проявляться как в низкой эффективности препаратов, так и в высоком проценте рецидивов после инфекции [26]. В случае чрезвычайных ситуаций, связанных с биотеррористическими мероприятиями, ученым предстоит интенсивная работа по данному направлению.

Также в целях профилактики и борьбы с биотерроризмом доказана возможность использования фагов в качестве вектора при конструировании комбинированных вакцин. Исследователи США сообщают о разработке такой совместной вакцины против чумы и сибирской язвы, двойная доза которой обеспечивает эффективную защиту как от легочной чумы, так и от ингаляционной сибирской язвы, а также вызывает стойкие иммунные реакции, специфичные для данных инфекций [45].

В настоящее время сибиреязвенные бактериофаги используются в основном в диагностических целях. Трудность применения фагов для терапии и профилактики этого заболевания заключается в наличии у возбудителя токсинов и капсулы, против которых фаги неэффективны [20]. Однако существуют предпосылки для использования высоковирулентных сибиреязвенных бактериофагов в лечебных целях. Предложен новый подход для лечения сибирской язвы, заключающийся в применении комплексного препарата на основе вирулентного бактериофага и специфических моноклональных антител, которые с успехом заменяют иммунную сыворотку [20]. В дополнение к вакцинации предложен способ подавления

численности вегетативной формы возбудителя сибирской язвы путем внесения специфического бактериофага в очаги инфекции [6].

Западными исследователями также с 2008 года проводились эксперименты по объединению двух фагов с различными литическими спектрами. Авторы считают, что данная комбинация способна стать не только средством для дезинфекции загрязненных спорами территорий препаратом фаговой диагностики, но и альтернативой для терапии сибирской язвы [44]. Другая работа была выполнена по расшифровке структуры фага SBP8a, активного как против вегетативной, так и против споровой форм *B. anthracis*. Также был изучен молекулярный механизм действия этого фага [34]. Показано, что фаги, активные против *B. anthracis*, должны содержать капсульные деполимеразы, способные разрушать капсулу для облегчения связывания фага с рецептором клеточной поверхности бактерий с целью их ликвидации [32, 40]. Кроме того, есть данные о способности фага прилипать к поверхности спор сибиреязвенной бактерии и внедрять свою ДНК путем конформационных изменений фаговых структур. Установлено, что фаги, используемые против спор сибирской язвы, должны быть устойчивыми к условиям окружающей среды [35].

В свою очередь, изучается возможность применения в терапии сибирской язвы эндолизинов фагов — ферментов, специфически лизирующих пептидогликан бактериальной клеточной стенки во время фагового литического цикла [33, 46]. Эндолизины имеют преимущества перед фагами, так как способны разрушать капсулированные формы бацилл, проявляют высокую специфичность и, обладая высокой ферментативной активностью, способны быстрее уничтожать бактерии [38, 43]. Устойчивость к лизинам индуцируется редко или вообще не индуцируется по сравнению с целыми фаговыми частицами. Использование для профилактики и лечения сибирской язвы лизинов, наряду с другими препаратами (глюкокортикоидами, ингибиторами ангиотензии и т.д.), является перспективным и требует дальнейшего изучения.

Фаготерапия чумными фагами была использована еще в 1925 году Ф. д'Эреллем, а затем в 1929 г. ученым L. Souvy [31]. Наиболее эффективными были фаги, культивированные на бактериях, выделенных в самом начале заболевания, когда гарантировано получение ультрачистых штаммов. Выздоровливали заболевшие, которым вводили бактериофаги непосредственно в бубон. Интересен тот факт, что среди агонизирующих и тяжелобольных был зафиксирован более высокий процент



выздоровления, чем среди больных со средней тяжестью инфекции, леченных сывороткой.

В 1941 году советскому микробиологу М.П. Покровской с соавторами удалось выделить из трупов сусликов поливалентный фаг, который обеспечивал полный лизис чумных бактерий в организме экспериментальных животных с септической и легочной формами чумы. Внутримышечное введение этого фага в комбинации с внутривенной инъекцией больным с тяжелой формой бубонной чумы, осложненной вторичной чумной пневмонией, в большинстве случаев приводило к благоприятному исходу болезни. Однако при первичной легочной и первичной септической чуме фаготерапия была неэффективна [19]. К сожалению, последующие попытки применения фагов для лечения чумы были неудачны, все тяжелые и средней тяжести случаи заболевания заканчивались летальным исходом. Терапия лабораторных животных бактериофагами при чуме также не давала положительных результатов [23]. Было высказано предположение, что при фаготерапии немаловажное значение имеет то, в какой стадии инфекционного процесса будет применен бактериофаг. Показана важность раннего введения фага до момента накопления в сыворотке антител. Экспериментально доказан тот факт, что задержку лизиса чумных микробов бактериофагом вызывала иммунная противочумная сыворотка, в то время как нормальные сыворотки этим свойством не обладали. Было высказано предположение, что бактерии адсорбируют на своей поверхности агглютинины, после чего не поддаются действию бактериофага [23].

Интересные опыты по лечению и профилактике чумы путем сочетанного применения стрептомицина и бактериофага проводили ученые из Ставропольского противочумного института в 1970-х годах. Установлено, что применение бактериофага на фоне антибиотикотерапии сразу же после заражения не оказывало выраженного терапевтического эффекта, однако увеличивало процент выживших морских свинок. Сделан вывод о необходимости тщательной подборки доз фагов, а также времени и продолжительности их введения [11].

Исследования по применению чумных бактериофагов возобновились как в России, так и за рубежом только в начале XXI века. Благодаря последним разработкам в области генетических исследований были расшифрованы геномы специфичных чумных бактериофагов, что дает надежду для их использования в лечении и профилактике этого заболевания [28]. Современные исследования направлены на изучение механизмов и условий адгезии частиц фага на поверхности чумного микроба, в резуль-

тате которой может увеличиться лизирующая активность фагов [2].

В настоящее время интерес российских и зарубежных ученых к лечебным и профилактическим свойствам бактериофагов возобновился по причине появления у микроорганизмов множественной резистентности к антимикробным препаратам [7]. Также в литературе имеются данные [17] о повышенной устойчивости патогенных возбудителей и к известным дезинфектантам. Российские исследователи считают целесообразным изучение генетических свойств и характеристик бактериофагов, так как фаготерапия демонстрирует очевидные успехи в персонализированном применении при тяжелых инфекционных заболеваниях, не поддающихся терапии известными антибиотиками [4], что может помочь в лечении именно особо опасных инфекций.

Следовательно, несмотря на отдельные неэффективные случаи использования бактериофагов, исторически также было продемонстрировано успешное применение фаготерапии и фагопрофилактики особо опасных инфекций. Споры вокруг эффективности фаготерапии велись из-за плохой документации данных по их использованию. Кроме того, большие трудности при осуществлении терапии были связаны с недостаточной готовностью науки и технологий того времени для применения сложных биопрепаратов. На момент открытия фагов известно о них было мало, впрочем, как и о патогенезе ООИ. В наши дни установлено, что фаги могут эффективно дополнять антибиотикотерапию, способны как разрушать бактерии в случае наличия биопленки, так и препятствовать ее образованию на начальных этапах формирования. Аналогичным образом нельзя забывать про тот немаловажный факт, что фаги являются абсолютно безопасными для организма человека [25]. В работе Асланова Б.И. (2019) представлены убедительные результаты, свидетельствующие о высокой противоэпидемической эффективности бактериофагов [1]. Актуально и изучение роли бактериофагов в эволюции возбудителей особо опасных инфекций. Известно, что фаги участвуют в ограничении численности популяции бактерий, переносе генетического материала между бактериями и передаче элективных факторов устойчивости (факторов внутривидового антагонизма микробов, расширения метаболических возможностей микроба, формирования биопленок и других). Феномен фаговой трансдукции может сопровождаться, в частности, приобретением бактериями генов устойчивости к антимикробным препаратам [22]. Эти обстоятельства диктуют необходимость глубокого изучения процессов

эволюции возбудителей особо опасных инфекций под влиянием бактериофагов.

Сейчас перед фаготерапией и фагопрофилактикой стоит ряд вопросов, решение которых позволит в дальнейшем использовать эти препараты с максимальной пользой в лечении и профилактике инфекционных болезней, в том числе и особо опасных. Для разработки эффективных препаратов на основе бактериофагов требуется проведение фундаментальных исследований. Это — изучение фармакодинамики и фармакокинетики фагов в организме; поиск и выделение высоковирулентных фагов, обладающих широким спектром литической активности и высокой степенью репродуктивности и стабильности; определение наличия иммунных реакций организма на фаги; устранение быстрого высвобождения токсинов при лизисе; преодоление трудностей в определении эффективной дозы фагов [42] и их фагоустойчивости, а также исключение возможности передачи генетического материала бактериальным хозяевам. Равным образом немаловажно изучение использования коктейлей из бактериофагов, имеющих различия в механизмах взаимодействия с бактериальной клеткой, которое способно существенно снизить накопление фагорезистентных вариантов в популяции возбудителя. Также необходимо выполнение полноценных клинических испытаний для решения вопросов, связанных с изучением дозировок, способов введения и возможных схем терапевтического применения препаратов бактериофагов. Без решения этих вопросов создание эффективных профилактических и лечебных препаратов на основе бактериофагов невозможно. При этом существенно отметить, что внимание современных исследователей к фаготерапии и фагопрофилактике ООИ подтверждает важность учета и осмысления исторического опыта по рассмотренной проблеме.

## Литература

1. Асланов Б.И., Любимова А.В., Зуева Л.П. Бактериофаги как эффективные противоэпидемические средства для купирования вспышек внутрибольничных инфекций // Журнал инфектологии. — 2019. — Т. 11. — № 1. — С. 65–70.
2. Бывалов А.А. и др. Иммунохимическое изучение рецепции бактериофага чумного Покровской // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2016. — № 4. — С. 16–21.
3. Винокурова Д.А., Суворцева Д.Э., Прикман В.А. Туляремия. Опасная инфекция сегодня // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Материалы IV Международной (74 Всероссийской)
- научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Всероссийского форума медицинских и фармацевтических вузов, посвященные 100-летию со дня рождения ректора Свердловского государственного медицинского института, профессора Василия Николаевича Климова, Екатеринбург, 10–12 апреля 2019 года. — Екатеринбург: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2019. — 793 с.
4. Власов В.В., Тикунова Н.В., Морозова В.В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине // Биохимия. — 2020. — Т. 85. — № 11. — С. 1587–1600.
5. Горшенин А.В. Участие микробиологов Э.В. Ермольевой и Л.М. Якобсон в научной дискуссии о судьбе производства советских холерных бактериофагов в 1967 году // Самарский научный вестник. — 2021. — Т. 10. — № 4. — С. 201–207.
6. Дятлов И.А., Маринин Л.И., Шишкова Н.А. и др. Средства обеззараживания сибиреязвенных почвенных очагов // Актуальные проблемы болезней общих для человека и животных: Всероссийская науч.-практич. конф. с международным участием, 23–24 мая 2012 г. — Ставрополь. — 2012. — С. 35–36.
7. Енгашев С.В. и др. Антибиотикорезистентность и альтернативные методы профилактики и борьбы с бактериальными инфекциями // Ветеринария. — 2021. — № 5. — С. 30–34.
8. Ермольева Э.В. Холера. — М.: Медгиз, 1942. — 123 с.
9. Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий // Антибиотики и химиотерапия. — 2019. — Т. 64. — № 5–6. — С. 64–68.
10. Иконникова Н.В. Бактериофаги — вирусы бактерий: учеб. пособие. — Минск: ИВЦ Минфина, 2017. — 41 с.
11. Козлов М.П., Васильев Н.В. Результаты лечения экспериментальной чумы у морских свинок стрептомицином в сочетании с бактериофагом // Микроб., эпид. и проф. инф. заб. — 1971. — С. 50–54.
12. Кочеткова А.О., Гаевская Н.Е., Павлович Н.В., Погожова М.П. Туляремиальные бактериофаги и перспективы их использования // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 1. — С. 42–46.
13. Кудрякова Т.А., Авроров В.П., Качкина Г.В., Шершенко Т.Е., Македонова Л.Д., Переседова Е.С., Кругликов В.Д., Мазрухо Б.Л., Пасюкова Н.И. Использование бактериофага в сочетании с глюколаном, молочнокислой культурой штамма лактобацилл при лечении экспериментальной холеры / Сбор. мат. пробл. ком. «Холера и патогенные для человека вибрионы». Вып. № 5. — 2002. — С. 111–113.

14. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Саямов С.Р. Поиск вирулентных фагов для лечения экспериментальной холеры / Междунар. конф. «Проблемы биологической и экологической безопасности». Оболенск, 2000. — С. 57.
15. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. — М.: ЗАО «Шико», 2013. — 560 с.
16. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги / Ростовский государственный научно-исследовательский противочумный институт МЗ СССР. Ростов-на-дону, 1990. — 159 с.
17. 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.
18. Пименов Н.В. Бактериофагия как основа для решения глобальной проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2020. — № 1. — С. 30–35.
19. Покровская М.П., Каганова Л.С., Морозенко М.А. Лечение ран бактериофагом. — М.; Л.: Медгиз, 1941. — 58 с.
20. Попов В.Г. и др. Роль бактериофагов *V. anthracis* в противодействии биотерроризму // Биомедицина. — 2006. — № 2. — С. 24–32.
21. Разгулин С.А., Григорьев А.А. Туляремийный бактериофаг: выделение и основные биологические свойства // Медицин. Альманах. — 2011. — Вып. 5. — № 18. — С. 198–201.
22. Ситников И.Г., Шошин А.А., Болхов А.Р. Возможность управления инфекцией // Инфекция и иммунитет. Специальный выпуск. — 2014. — С. 110.
23. Сутин И.А. Бактериофаги и их применение в медицинской практике. — Медгиз, 1958.
24. Тюрин А.В. и др. Активность препарата бактериофагов в отношении антибиотикорезистентных штаммов холерных вибрионов El Tor // Антибиотики и химиотерапия. — 2018. — Т. 63. — № 7–8. — С. 29–32.
25. Щербенков И.М. Бактериофаги. Что мы знаем о них? // Медицинский совет. — 2013. — № 2. — С. 56–62.
26. Щипелева И.А., Марковская Е.И., Кретенчук О.Ф. Антибактериальная терапия туляремии: современное состояние и перспективы // Антибиотики и химиотерапия. — 2020. — Т. 65. — № 3–4. — С. 39–44.
27. Abeer M.A. Isolation and characterization of a novel bacteriophage, asc10, that lyses *Francisella tularensis*: dissertation for the degree of doctor of philosophy. — Colorado, 2014. — 112 p.
28. Anisimov A.P., Amoako K.K. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics // Journal of medical microbiology. — 2006. — Vol. 55. — No. 11. — P. 1461–1475.
29. Bhandare S. et al. Reviving phage therapy for the treatment of cholera // The Journal of Infectious Diseases. — 2019. — Vol. 219. — No. 5. — P. 786–794.
30. Bhowmick T.S. et al. Pathogenic potential of vibriophages against an experimental infection with *Vibrio cholerae* O1 in the RITARD model // International Journal of Antimicrobial Agents. — 2009. — Vol. 33. — No. 6. — P. 569–573.
31. Couvy L. Essais de traitement de la peste par le bactériophage / Bulletins de la Société de Pathologie Exotique. — Tome 23. — Paris: Masson, 1930.
32. Criscuolo E., Spadini S., Lamanna J., Ferro M., Burioni R. Bacteriophages and their immunological applications against infectious threats // J. Immunol Res. — 2017. — Art. 3780697. doi:10.1155/2017/3780697.
33. Domingo-Calap P., Delgado-Martínez J. Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era // Antibiotics (Basel). — 2018. — Vol. 7. — No. 3. — Art.66. doi: 10.3390/antibiotics7030066.
34. Fu X., Walter M.H., Paredes A., Morais M.C., Liu J. The mechanism of DNA ejection in the *Bacillus anthracis* spore-binding phage 8a revealed by cryo-electron tomography // Virology. — 2011. — Vol. 421. — No. 2. — P. 141–148.
35. Henry M., Biswas B., Vincent L., et al. Development of a highly throughput assay for indirectly measuring phage growth using the OmniLog system // Bacteriophage. — 2012. — Vol. 2. — No. 3. — P. 159–167.
36. Hsueh B.Y., Waters C.M. Combating cholera // F1000Research. — 2019. — Vol. 8. — F1000 Faculty Rev-589. doi: 10.12688/f1000research.18093.1.
37. Jaiswal A. et al. Comparative analysis of different oral approaches to treat *Vibrio cholerae* infection in adult mice // International Journal of Medical Microbiology. — 2014. — Vol. 304. — No. 3–4. — P. 422–430.
38. Maciejewska B., Olszak T., Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: An ambitious and also a realistic application? // Appl Microbiol Biotechnol. — 2018. — Vol. 102. — No. 6. — Art. 25632581. doi:10.1007/s00253-018-8811-1.
39. Myelnikov D. An alternative cure: The adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922–1955 // Journal of the History of Medicine and Allied Sciences. — 2018. — Vol. 73. — No. 4. — P. 385–411.
40. Negus D., Burton J., Sweed A., Gryko R., Taylor P. Poly- $\gamma$ -D-glutamic acid capsule interferes with lytic infection of *Bacillus anthracis* by *B. anthracis*-specific bacteriophages // Applied and Environmental Microbiology. — 2013. — Vol. 79. — No. 2. — P. 714–717.
41. Oyston P.C., Sjostedt A., Titball R.W. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis* // Nat Rev Microbiol. — 2004. — Vol. 2. — No. 12. — P. 967–978.
42. Rohde C. et al. Expert opinion on three phage therapy related topics: bacterial phage resistance, phage training and prophages

- in bacterial production strains // *Viruses*. — 2018. — Vol. 10. — No. 4. — Art. 178. doi: 10.3390/v10040178.
43. Son B., Yun J., Lim J., Shin H., Heu S., Ryu S. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4 // *BMC Microbiology*. — 2012. — Vol. 12. — Art. 33. doi: 10.1186/1471-2180-12-33.
  44. Sozhamannan S., McKinstry M., Lentz S.M., et al. Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2008. — Vol. 74. — No. 21. — P. 6792–6796.
  45. Tao P., Mahalingam M., Zhu J., Moayeri M., Sha J., Lawrence W.S., Leppla S.H., Chopra A.K., Rao V.B. Double vaccine against anthrax and plague based on bacteriophage T4 nanoparticles // *MBio*. — 2018. — Vol. 9. — No. 5. — e01926-18. doi: 10.1128/mBio.01926-18.
  46. Tišáková L., Godány A. Bacteriophage endolysins and their use in biotechnological processes // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. — 2014. — Vol. 3. — No. 2. — P. 164–170.
  47. Yen M., Cairns L.S., Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models // *Nature communications*. — 2017. — Vol. 8. — No. 1. — P. 1–7.
- References**
1. Aslanov BI, Lyubimova AV, Zuyeva LP. Bakteriofagi kak effektivnyye protivoepidemicheskiye sredstva dlya kupirovaniya vspyshek vnutribol'nichnykh infektsiy. *Zhurnal infektologii* 2019; 11(1):65–70 (in Russian).
  2. Byvalov AA i dr. Immunokhimicheskoye izucheniye retseptsii bakteriofaga chumnogo Pokrovskoy. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2016; 4:16–21 (in Russian).
  3. Vinokurova DA, Surovtseva DE, Prikman VA. Tulyaremiya. Opasnaya infektsiya segodnya. Aktual'nyye voprosy sovremennoy meditsinskoj nauki i zdravookhraneniya: Materialy IV Mezhdunarodnoy (74 Vserossiyskoj) nauchno-prakticheskoy konferentsii molodykh uchenykh i studentov, Vserossiyskogo foruma meditsinskikh i farmatsevticheskikh vuzov, posvyashchennyye 100-letiyu so dnya rozhdeniya rektora Sverdlovskogo gosudarstvennogo meditsinskogo instituta, professora Vasiliya Nikolayevicha Klimova, Yekaterinburg, 10–12 aprelya 2019 goda. Yekaterinburg: Federal'noye gosudarstvennoye byudzhethnoye obrazovatel'noye uchrezhdeniye vysshego obrazovaniya «Ural'skiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet» Ministerstva zdravookhraneniya Rossiyskoj Federatsii, 2019: 793 (in Russian).
  4. Vlasov VV, Tikunova NV, Morozova VV. Bakteriofagi kak terapevticheskiye preparaty: chto sderzhivayet ikh primeneniye v meditsine. *Biokhimiya* 2020; 85(11):1587–1600 (in Russian).
  5. Gorshenin AV. Uchastiye mikrobiologov ZV Yermol'yevoy i LM Yakobson v nauchnoy diskussii o sud'be proizvodstva sovetskikh kholernykh bakteriofagov v 1967 godu. *Samarskiy nauchnyy vestnik* 2021; 10(4):201–207 (in Russian).
  6. Dyatlov IA, Marinin LI, Shishkova NA i dr. Sredstva obezrazhivaniya sibireyazvennykh pochvennykh ochagov. Aktual'nyye problemy bolezney obshchikh dlya cheloveka i zhivotnykh: Vserossiyskaya nauch-praktich. konf. s mezhdunarodnym uchastiyem, 23–24 maya 2012 g. Stavropol', 2012: 35–36 (in Russian).
  7. Yengashev SV i dr. Antibiotikorezistentnost' i al'ternativnyye metody profilaktiki i bor'by s bakterial'nymi infektsiyami. *Veterinariya* 2021; 5:30–34 (in Russian).
  8. Yermol'yeva ZV. Kholera. Moscow: Medgiz, 1942: 123 (in Russian).
  9. Yefimenko TA, Terekhova LP, Yefremenkova OV. Sovremennoye sostoyaniye problemy antibiotikorezistentnosti patogennykh bakteriy. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2019; 64(5–6):64–68 (in Russian).
  10. Ikonnikova NV. Bakteriofagi — virusy bakteriy: ucheb posobiye. Minsk: IVTS Minfina, 2017: 41 (in Russian).
  11. Kozlov MP, Vasil'yev NV. Rezul'taty lecheniya eksperimental'noy chumy u morskikh svinok streptomitsinom v sochetanii s bakteriofagom. *Mikrob, epid i prof inf zab*, 1971: 50–54 (in Russian).
  12. Kochetkova AO, Gayevskaya NYe, Pavlovich NV, Pogozhova MP. Tulyaremiynyye bakteriofagi i perspektivy ikh ispol'zovaniya. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2019; 15(1):42–46 (in Russian).
  13. Kudryakova TA, Avrorov VP, Kachkina GV, Shershenko TYe, Makedonova LD, Peresedova YeS, Kruglikov VD, Mazrukho BL, Pasyukova NI. Ispol'zovaniye bakteriofaga v sochetanii s glyukosolanom, molochnokisloy kul'turoy shtamma laktobatsill pri lechenii eksperimental'noy kholery. *Sbor mat probl kom. «Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony»*. Vyp 5. 2002: 111–113 (in Russian).
  14. Kudryakova TA, Makedonova LD, Kachkina GV, Sayamov SR. Poisk virulentnykh fagov dlya lecheniya eksperimental'noy kholery. *Mezhdunar konf «Problemy biologicheskoy i ekologicheskoy bezopasnosti»*. Obolensk, 2000: 57 (in Russian).
  15. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney: prakticheskoye rukovodstvo. Pod redaktsiyey akademika RAMN GG Onishchenko, akademika RAMN VV Kutyreva. Izd. 2-ye, pererabotannoye i dopolnennoye. Moscow: ZAO «Shiko», 2013: 560 (in Russian).
  16. Lomov YuM, Somova AG, Kudryakova TA. Kholernyye fagi. Rostovskiy gosudarstvennyy nauchno-issledovatel'skiy protivochumnyy institut MZ SSSR. Rostov-na-donu, 1990: 159 (in Russian).
  17. 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).
18. Pimenov NV. Bakteriofagiya kak osnova dlya resheniya global'noy problemy antibiotikorezistentnosti patogennykh bakteriy. Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya 2020; 1:30–35 (in Russian).
  19. Pokrovskaya MP, Kaganova LS, Morozenko MA. Lecheniye ran bakteriofagom. Moscow; Leningrad: Medgiz, 1941: 58 (in Russian).
  20. Popov VG i dr. Rol' bakteriofagov *B. anthracis* v protivodeystvii bioterrorizmu. Biomeditsina 2006; 2:24–32 (in Russian).
  21. Razgulin SA, Grigor'yev AA. Tulyaremiynny bakteriofag: vydeleniye i osnovnyye biologicheskiye svoystva. Meditsin Al'manakh 2011 5(18):198–201 (in Russian).
  22. Sitnikov IG, Shoshin AA, Bolkhov AR. Vozmozhnost' upravleniya infektsiyey. Infektsiya i immunitet. Spetsial'nyy vypusk 2014: 110 (in Russian).
  23. Sutin IA. Bakteriofagi i ikh primeneniye v meditsinskoy praktike. Medgiz, 1958 (in Russian).
  24. Tyurina AV i dr. Aktivnost' preparata bakteriofagov v otnoshenii antibiotikorezistentnykh shtammov kholernykh vibriionov El Tor. Antibiotiki i khimioterapiya 2018; 63(7–8):29–32 (in Russian).
  25. Shcherbenkov IM. Bakteriofagi. Chto my znayem o nikh? Meditsinskiy sovet 2013; 2:56–62 (in Russian).
  26. Shchipeleva IA, Markovskaya YeI, Kretenchuk OF. Antibakterial'naya terapiya tulyaremi: sovremennoye sostoyaniye i perspektivy. Antibiotiki i khimioterapiya 2020; 65(3–4):39–44 (in Russian).
  27. Abeer M.A. Isolation and characterization of a novel bacteriophage, asc10, that lyses *Francisella tularensis*: dissertation for the degree of doctor of philosophy:lorado, 2014: 112.
  28. Anisimov AP, Amoako KK. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics. Journal of medical microbiology 2006; 55(11):1461–1475.
  29. Bhandare S et al. Reviving phage therapy for the treatment of cholera. The Journal of Infectious Diseases 2019; 219(5):786–794.
  30. Bhowmick TS et al. Pathogenic potential of vibriophages against an experimental infection with *Vibrio cholerae* O1 in the RITARD model. International Journal of Antimicrobial Agents 2009; 33(6):569–573.
  31. Couvy L. Essais de traitement de la peste par le bactériophage. Bulletins de la Société de pathologie exotique. Tome 23. Paris: Masson, 1930.
  32. Criscuolo E, Spadini S, Lamanna J, Ferro M, Burioni R. Bacteriophages and their immunological applications against infectious threats. J Immunol Res 2017:3780697. doi:10.1155/2017/3780697.
  33. Domingo-Calap P, Delgado-Martínez J. Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era. Antibiotics (Basel) 2018; 7(3):66. doi: 10.3390/antibiotics7030066.
  34. Fu X, Walter MH, Paredes A, Morais MC, Liu J. The mechanism of DNA ejection in the *Bacillus anthracis* spore-binding phage 8a revealed by cryo-electron tomography. Virology 2011; 421(2):141–148.
  35. Henry M, Biswas B, Vincent L, et al. Development of a highly throughput assay for indirectly measuring phage growth using the OmniLog system. Bacteriophage 2012; 2(3):159–167.
  36. Hsueh B.Y., Waters C.M. Combating cholera. F1000Research 2019; 8:F1000 Faculty Rev-589. doi: 10.12688/f1000research.18093.1.
  37. Jaiswal A et al. Comparative analysis of different oral approaches to treat *Vibrio cholerae* infection in adult mice. International Journal of Medical Microbiology 2014; 304(3–4):422–430.
  38. Maciejewska B, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? Appl Microbiol Biotechnol 2018; 102(6):25632581. doi:10.1007/s00253-018-8811-1.
  39. Myelnikov D. An alternative cure: the adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922–1955. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences 2018; 73(4):385–411.
  40. Negus D, Burton J, Sweed A, Gryko R, Taylor P. Poly- $\gamma$ -D-glutamic acid capsule interferes with lytic infection of *Bacillus anthracis* by *B. anthracis*-specific bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology 2013; 79(2):714–717.
  41. Oyston PC, Sjostedt A, Titball RW. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. Nat Rev Microbiol 2004; 2(12):967–978.
  42. Rohde C et al. Expert opinion on three phage therapy related topics: Bacterial phage resistance, phage training and prophages in bacterial production strains. Viruses 2018; 10(4):178. doi: 10.3390/v10040178.
  43. Son B, Yun J, Lim J, Shin H, Heu S, Ryu S. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4. BMC Microbiology 2012; 12:33. doi: 10.1186/1471-2180-12-33.
  44. Sozhamannan S, McKinstry M, Lentz SM, et al. Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity. Applied and Environmental Microbiology 2008; 74(21):6792–6796.
  45. Tao P, Mahalingam M, Zhu J, Moayeri M, Sha J, Lawrence WS, Leppla SH, Chopra AK, Rao VB. Double vaccine against anthrax and plague based on bacteriophage T4 nanoparticles. MBio 2018; 9(5):e01926-18. doi: 10.1128/mBio.01926-18.
  46. Tišáková L, Godány A. Bacteriophage endolysins and their use in biotechnological processes. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2014; 3(2):164–170.
  47. Yen M, Cairns LS, Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. Nature communications 2017; 8(1):1–7.

## THE USE OF BACTERIOPHAGES IN THE THERAPY AND PREVENTION OF PARTICULARLY DANGEROUS INFECTIONS

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

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

A review of the literature on the use of bacteriophages in the treatment and prevention of especially dangerous infections is presented. The importance of a recent detailed study of the cholera phage and tularemia bacteriophage, as well as the search for similar optimal approaches in relation to anthrax and plague, is emphasized. The review combines a comprehensive historical approach with the actualization of current trends in the theory and methodology of phage therapy and phage prophylaxis. In this context, the authors define: the study of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of phages in the body; search and isolation of highly virulent phages with a wide range of lytic activity and a high degree of reproduction and stability; determination of the presence of immune responses of the body to phages, etc.

*Keywords:* bacteriophages, especially dangerous infections, therapy, prevention, successive tasks, reviews.

### **Address:**

Tyurina A.V.

Junior researcher, laboratory of bacteriophages,

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor

E-mail: tyurina.anuta2010@yandex.ru

### **Для цитирования:**

Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Труфанова А.А., Филиппенко А.В., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Погожова М.П., Анопrienko А.О. Использование бактериофагов в терапии и профилактике особо опасных инфекций. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3): 70–78.

### **For citation:**

Gaevskaya N.E., Tyurina A.V., Trufanova A.A., Filippenko A.V., Ivanova I.A., Omelchenko N.D., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O. The use of bacteriophages in the therapy and prevention of particularly dangerous infections. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):70–78 (in Russian).

# СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОИЗВОДСТВА БИОТОПЛИВА ИЗ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

П.К. ПОТАПОВ, И.В. МАРКИН, И.А. ЗАЙЦЕВ\*

*Федеральное государственное автономное учреждение «Военный инновационный технополис «ЭРА»,  
Анапа*

На сегодняшний день проблема исчерпания невозобновляемых источников сырья для производства традиционных видов топлива является ключевым драйвером поиска альтернативных источников энергии. Глобальное потепление и изменения климата также подталкивают человечество к поиску более экологичных, с точки зрения производства и применения, видов топлива. На этом фоне в последние десятилетия как в России, так и по всему миру наблюдается повышенный интерес к производству биотоплива третьего поколения с применением зеленых микроводорослей, способных расти на доступных и дешевых отходах пищевого и коммунального хозяйства. Кроме того, разработка технологии получения биодизеля и биоэтанола из биомассы может являться потенциальной основой для создания автономных обособленных комплексов, в том числе и городов военного назначения, не зависящих от внешних поставок топлива, что крайне актуально для труднодоступных районов нашей обширной страны и Арктики.

*Ключевые слова:* биотопливо, биоэтанол, биодизель, микроводоросли, альтернативная энергетика.

## Введение

Устойчивое развитие человеческой цивилизации в настоящее время осуществляется с затратами огромного количества ресурсов, борьба за истощающиеся источники которых доминирует в мировой политике. Экстенсивная эксплуатация человеком недр планеты приводит к возрастающей угрозе ресурсного голода, а также экологических, климатических, техногенных катастроф. Все это подтверждает недостаточную эффективность многих техногенных систем, созданных человеком. В противовес этому природные процессы, стабильно протекающие на протяжении миллионов лет, представляют собой устойчивые системы, способные существовать без сбоев и риска возникновения глобальных катастроф. Именно поэтому, как отмечают ученые НИЦ «Курчатовский институт» во главе с М.В. Ковальчуком, выходом из мирового кризиса использования энергоресурсов может служить применение так называемых природоподобных технологий, воспроизводящих системы и процессы живой природы в виде технических систем и технологических процессов, интегрированных в естественный природный ресурсооборот [1].

Биодизель представляет собой смесь эфиров различных жирных кислот, получаемую путем этерификации спиртами различных жирных кислот. Повышенный интерес к производству биодизеля, возникший в последние десятилетия, можно объяснить несколькими причинами. Биодизель является возобновляемым источником энергии, в то время как, согласно прогнозам ученых, существующие на планете запасы нефти будут исчерпаны менее чем через 50 лет при сохранении текущего уровня потребления. Использование биодизеля оказывает менее негативный эффект на окружающую среду по сравнению с традиционными видами топлива. Сжигание биодизеля не приводит к выбрасыванию избыточного углерода в атмосферу, поскольку для его производства используется биомасса микроорганизмов. При сгорании биодизеля выделяется на 10% меньше монооксида углерода (CO), а также не образуются токсичные продукты горения [41]; иными словами, биодизель представляет более экологичным видом топлива, нежели традиционное топливо. При этом биодизель превосходит традиционные виды топлива по показателям биоразлагаемости и точки воспламенения [6].

## Современная классификация биотоплива

В зависимости от источника сырья для производства биотопливо подразделяется на три категории: биотопливо первого, второго и третьего поколения.

Традиционным сырьем для получения биодизеля первого поколения служат растительные масла: соевое,

© 2022 г. П.К. Потапов, И.В. Маркин, И.А. Зайцев

\* **Автор для переписки:**

Зайцев Игорь Анатольевич

младший научный сотрудник, ФГАУ ВИТ «ЭРА»

E-mail: era\_otd2@mil.ru

пальмовое, подсолнечное и рапсовое [10]. Выращивание культур для массового производства биотоплива первого поколения требует огромных площадей земли, в результате чего создается конкуренция за землю с пищевыми культурами. Это, в свою очередь, представляет угрозу пищевой безопасности страны и способно существенно поднять стоимость съедобных культур, таких как соевые бобы [3]. Следовательно, широкое применение биотоплива первого поколения приведет к повышению стоимости пищевых масел, равно как и самого биодизеля. Также стоит добавить, что выращивание коммерческих культур для производства биотоплива связано с проблемой сокращения площади лесов в определенных странах, поскольку для ослабления конкуренции с пищевыми культурами за землю для производства биотоплива отводятся лесные площади.

Биотопливо второго поколения производится из пищевых отходов и лигноцеллюлозных непищевых культур, таких как ятрофа. Пищевые отходы, представляющие собой животные жиры и отработанные пищевые масла, не влияют на пищевую безопасность, что является ключевым преимуществом перед биотопливом первого поколения, однако при производстве биотоплива из непищевых культур возникают проблемы, связанные с низкой текучестью при пониженных температурах, а насыщенные жирные кислоты, содержащиеся в животных жирах, застывают даже при комнатных температурах [2]. Непищевые культуры также могут расти на землях, не приспособленных для выращивания культурных растений, и способны давать значительные урожаи, не требуя при этом особого ухода; однако их масла содержат большое количество свободных жирных кислот, что приводит к увеличению затрат на производство биотоплива [23]. Еще одной проблемой, связанной с использованием биотоплива второго поколения, представляется низкая продуктивность используемых источников, что приводит к увеличению необходимых для их выращивания площадей. Важен также и вопрос энергетического баланса, поскольку затраты на производство биотоплива второго поколения могут достигать половины энергии, содержащейся в таком топливе [14]. Дальнейшая критика использования биотоплива первого и второго поколения связана с нарушением баланса парниковых газов, возникающим из-за нецелевого использования земель [40].

Более приемлемой альтернативой служит использование жиров, полученных из биомассы зеленых водорослей, в качестве сырья для производства биотоплива третьего поколения. Микроводоросли, относящиеся к фотосинтезирующим организмам, способны улавливать

солнечную энергию и, используя воду и атмосферный  $\text{CO}_2$ , производить биомассу в форме органических веществ, таких как липиды. Липиды микроводорослей включают в себя два типа: нейтральные и полярные липиды. Нейтральные липиды выполняют функцию депонирования энергии, а полярные липиды выполняют функцию структурной части клеточных органелл и мембран. В ходе фотосинтеза нейтральные липиды накапливаются в клетке микроводорослей в виде триацилглицеридов (ТАГ). Триацилглицериды могут быть затем переработаны посредством процесса трансэтерификации в различные виды метиловых и этиловых эфиров жирных кислот — основных компонентов биодизеля. Липидная продуктивность микроводорослей в расчете на занимаемую площадь может в 20 раз превышать таковую у масличных растений. Содержание липидов в сухой биомассе варьирует от 20 до 40%, а у некоторых штаммов оно может достигать до 85% [50]. Кроме того, микроводоросли обладают более высокой скоростью роста и способны расти в условиях повышенной солености, которые неприемлемы для выращивания высших растений. Они используют большую часть солнечной энергии, обнаруживают высокую эффективность фотосинтеза и требуют лишь небольшого количества питательных веществ для роста [45]. По сравнению с биомассой деревьев и культурных растений липиды микроводорослей обладают меньшей стоимостью транспортировки.

### **Основные проблемы производства биодизеля третьего поколения**

Несмотря на все существующие перспективы получения биотоплива третьего поколения с использованием микроводорослей, разрабатываемые процессы являются энергетически затратными, в связи с чем биотопливо третьего поколения на сегодняшний день не может конкурировать с традиционным топливом, с экономической точки зрения [3]. Для преодоления этого барьера необходима разработка концепций производства, предусматривающих извлечение энергии из остатков водорослевой биомассы после экстракции липидов. В частности, некоторые микроводоросли имеют высокое содержание крахмала, который является отличным сырьем для производства биоэтанола путем осахаривания и ферментации дрожжами [37]. Кроме того, в ходе процесса трансэтерификации микроводорослевых липидов в биодизель в больших количествах образуется глицерин как побочный продукт. Этот глицерин может применяться для производства более ценных продуктов, использоваться для гетеротрофного или миксотрофного роста микроводорослей, или для выработки метана, что



позволит реализовать концепцию полностью безотходного производства.

Существуют также и проблемы технического характера, например, связанные со сбором клеточной биомассы. Одноклеточные микроводоросли обычно имеют низкие плотности и находятся в суспензии, что затрудняет их отделение. Неэффективное удаление влаги может осложнить последующие стадии экстракции липидов органическими растворителями. Процедуры экстракции микроводорослевых липидов в промышленных объемах довольно сложны и все еще находятся на стадии разработки [37]. Экстракция биотоплива из микроводорослей затрудняется и значительным количеством жирорастворимых пигментов, которые они синтезируют при автотрофном культивировании. Они будут ко-экстрагироваться вместе с целевыми липидами, поскольку органические растворители не селективны в этом плане. Присутствие жирорастворимых пигментов в липидном экстракте затрудняет фракционирование (очистку) биотоплива, что может отразиться на его качестве [17].

При культивировании микроводорослей в системах открытых прудов возникает проблема появления консументов в виде простейших и зоопланктона, активно поглощающего водорослевые клетки [27]. Для снижения количества консументов необходимо принимать комплекс дополнительных мер, например, фильтрацию среды, понижение концентрации растворенного кислорода или повышение рН среды. Все эти методы имеют свои недостатки и будут приводить к дополнительным затратам.

Другая проблема, связанная с использованием биодизеля в качестве топлива, заключается в его подверженности бактериальному окислению, что в конечном счете приводит к внутренней коррозии хранилищ [35], в связи с чем существует необходимость изменения дизайна конструкций имеющихся в наличии хранилищ биотоплива.

#### **Типы культивирования микроводорослей**

Имеются три принципиально различных стратегии культивирования микроводорослей: автотрофное культивирование, гетеротрофное и миксотрофное культивирование.

##### *Автотрофный рост, системы открытых прудов*

Открытые пруды являются наиболее распространенным способом культивирования микроводорослей и самым дешевым методом производства биомассы в промышленных масштабах. Эти системы подразделяются на естественные водные системы (озера, лагуны и пруды) или искусственные пруды и сооружения. Искусственные

системы могут быть вырыты в грунте и использоваться буквально, или покрываться непроницаемыми материалами, или же вовсе могут быть построены из стен. Отсутствие покрытия прудов позволяет уменьшить их стоимость, но при этом вызывает проблемы контаминации, утечки культуральной среды, наличия иловой взвеси, из-за чего их возможно использовать для выращивания лишь некоторых видов водорослей в определенных условиях почв и окружающей среды. Оптимальная глубина таких прудов обычно составляет 15–50 см, что позволяет обеспечить доступ к солнечному свету для всей биомассы, особенно в конце экспоненциальной фазы роста [30]. Размер пруда также имеет значение при культивировании микроводорослей: более маленькие водоемы способны обеспечить более высокий урожай биомассы в расчете на литр среды.

Недостатки таких открытых систем заключаются в необходимости строгого контроля условий внешней среды для избегания загрязнения, испарения воды, контаминации быстрорастущими бактериями и другими видами микроводорослей. Невозможно контролировать сезонное изменение температуры и напрямую влиять на количество CO<sub>2</sub> и солнечного света. Низкие температуры (ниже 17 °C) приводят к остановке роста клеток, а слишком высокие температуры могут вызвать их гибель. Кроме того, в конце фазы логарифмического роста, когда прирост биомассы максимален, некоторые клетки могут не получать достаточного количества света, будучи затененными другими клетками, плавающими около поверхности. Это может приводить к снижению выхода биомассы, следовательно, необходимо создавать условия для постоянного перемешивания среды [9].

Открытые водоемы подходят для выращивания небольшого количества видов водорослей, способных выдерживать экстремальные условия среды, в число которых входят *Spirulina*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Chlorella* и другие [38], однако 98% объема коммерчески производимых водорослей выращиваются именно в открытых системах [16].

##### *Автотрофный рост, закрытые фотобиореакторы*

Фотобиореакторы были разработаны для решения проблем, характерных для открытых систем, то есть выращивания биомассы в контролируемых и управляемых условиях (рН, интенсивность света, температура, концентрация CO<sub>2</sub>), а также культивирования чувствительных штаммов микроводорослей, которые не способны конкурировать и расти в жестких условиях открытых прудов [42]. Фотобиореакторы можно размещать как

внутри, так и снаружи помещений, используя в качестве источника света искусственное освещение или солнечную энергию соответственно. Реакторы могут быть наклонены под различными углами и использовать рассеянный и отраженный свет, что влияет на продуктивность культур. Материалы, используемые для изготовления реакторов, должны не оказывать токсического действия на клетки, быть высоко прозрачными, иметь устойчивость к механическому и химическому воздействию, обладать невысокой стоимостью. Преимуществом закрытых систем культивирования является более высокая концентрация биомассы (2–5 г/л), меньшее время сбора биомассы, пониженный риск контаминации, а также высокое отношение площади поверхности к объему (25–125 м<sup>-1</sup>). Снабжение светом может происходить при помощи оптоволоконных, погруженных в воду ламп или флуоресцентных источников света. Как правило, в фотобиореакторах обнаруживается центральная темная зона и более интенсивно освещенная периферическая область. Обогащенный углекислым газом воздух подается внутрь реактора, создавая турбулентный поток, переносящий клетки между светлой и темной зонами, и обеспечивает массообмен углекислого газа и кислорода. Частота перемещений клеток между темной и светлой зонами зависит от интенсивности потока, концентрации клеток, и уровня внешнего освещения.

Проблемы, возникающие при использовании фотобиореакторов, включают в себя перегрев, увеличение количества зон с недостаточной освещенностью и фотоингибирование в областях, где наблюдается избыток света, повреждение клеток под действием гидродинамического стресса и обрастание стенок реакторов [13]. Кроме того, фотобиореакторы представляют собой гораздо более сложную, а значит, дорогую конструкцию и требуют существенных затрат на стерилизацию [5]. При масштабировании биореакторов происходит увеличение доли темных зон, что выражается в уменьшении роста клеток, а также повышение затрат при культивировании из-за энергообеспечения механизма перемешивания [24].

Классификация фотобиореакторов основывается на их дизайне и режиме работы. Наиболее популярные типы фотобиореакторов — это flat-plate фотобиореакторы, эйрлифтные трубчатые системы и колоночные фотобиореакторы; однако существуют и некоторые иные конструкции.

#### *Гетеротрофный рост*

Несмотря на то, что микроводоросли способны эффективно использовать энергию света, их фотоавтотрофный рост часто замедлен, в основном из-за недо-

статочности света в условиях высокой плотности клеток или фотоингибирования при высокой интенсивности света [46]. Избавиться от этих недостатков можно при использовании гетеротрофного способа культивирования микроводорослей в традиционных микробных ферментерах.

Гетеротрофное культивирование микроводорослей имеет несколько преимуществ по сравнению с фотоавтотрофным: отсутствует необходимость обеспечения равномерного распределения света по всему объему культуры, имеется более полный контроль над процессом, а также достигается более высокая концентрация клеток при росте на органических источниках углерода [33]. В гетеротрофной культуре как рост клеток, так и биосинтез продуктов во многом зависят от состава среды и внешних факторов. Наибольшее влияние оказывает тип используемого источника углеродов, в качестве которого наиболее часто применяются глюкоза, глицерин, глутамат или ацетаты. Liu S.M. и соавторы [25] провели сравнение нескольких источников углерода, используемых при гетеротрофном росте *C. vulgaris*, и пришли к выводу, что наиболее предпочтительна глюкоза. Сточные воды, богатые азотом, также могут рассматриваться в качестве сред для культивирования [7]. Следует отметить, что при гетеротрофном росте клетки микроводорослей обычно накапливают больше липидов и углеводов, чем в случае фотоавтотрофного роста [31].

Несмотря на все преимущества, большим недостатком гетеротрофных систем являются высокая стоимость сахаров и проблема с их доступностью, то есть конкуренция за субстрат с пищевой отраслью и получением биотоплива из углеводов [9]. Для того чтобы уменьшить стоимость получаемого биотоплива, следует использовать более дешевые источники углерода, такие как гидролизат кукурузной муки или мелассу. Было продемонстрировано, что, культивируя *C. protothecoides* с использованием гидролизата кукурузной муки, возможно получить хороший урожай биомассы (15 г/л) с высоким содержанием липидов в клетках (55,2%) [47].

#### *Миксотрофный рост*

Некоторые микроводоросли способны расти, комбинируя автотрофный и гетеротрофный способы роста, то есть одновременно снабжая себя органическими веществами посредством фотосинтеза и путем расщепления органического субстрата. Культивируемые в таких системах клетки не имеют строгой зависимости от доступности света или органического субстрата для поддержания роста. Исследования показывают, что в таких смешанных условиях роста можно добиться

еще большей продуктивности биомассы и липидов, по сравнению с фотоавтотрофным и гетеротрофным ростом [49]. Основное преимущество миксотрофного метаболизма заключается в снижении количества органического субстрата, используемого для роста микроводорослей, и ограничений, связанных с фотосинтезом [9].

### Способы увеличения липидной продуктивности микроводорослей

#### Ограничение по источникам *N*, *P* и *S*

Микроводоросли способны реагировать на стрессовые условия, такие как голодание, модифицируя свои ключевые биохимические пути для синтеза различных запасующих соединений. Считается, что ограничение по питательным веществам служит простым и экологически безопасным подходом к контролю клеточного цикла с целью повышения продуктивности липидов. На сегодняшний день ограничение по питательным веществам признано наиболее успешной и широко используемой стратегией. Изменение содержания микронутриентов, таких как азот, фосфор и сера, в культуральной среде приводит к изменению макромолекулярного состава в клетках микроводорослей. В условиях стресса, связанного с питанием, происходит накопление липидов, и в качестве доминирующего компонента образуются триацилглицериды. Тем не менее данную стратегию следует использовать с осторожностью, так как у некоторых видов недостаток питательных веществ не способствует накоплению липидов. Например, при дефиците питательных веществ у микроводорослей *Dunaliella salina* содержание липидов снижалось с 25 до 9%, а углеводов увеличивалось — с 16 до 56% [4]. Недостаток азота, фосфора и/или серы широко признан в качестве основного индуктора липидов для зеленых видов микроводорослей. Среди этих способов ограничение по азоту представляется наиболее изученной и широко используемой стратегией. Ито и др. [21] продемонстрировали, что в условиях азотного стресса количество нейтральных липидов в клетках микроводорослей значительно увеличивалось, в то время как количество аминокислот существенно снижалось на 95 процентов по сравнению с контролем. Иллман и коллеги [20] отмечали, что содержание липидов в *C. vulgaris*, культивируемой на среде с низким содержанием азота, более чем в 2 раза (40%) превышало содержание липидов в контроле (18%). Однако необходимо иметь в виду, что бедные по азоту среды хоть и способны стимулировать накопление липидов, также могут приводить и к существенному снижению накопления биомассы, из-за ингибирования клеточного деления в условиях стресса. Обычно кон-

центрации азота ниже 5 мМ не покрывают потребности микроводорослей в азоте [26]. Мандал и Маллик [28] культивировали микроводоросли *Scenedesmus obliquus* в условиях фосфорного голодания и наблюдали увеличение содержания липидов с 10,0 до 29,5%. Сато и коллеги [39] предположили, что дефицит серы может заставить микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* накапливать ТАГ в клетках за счет переключения метаболизма углерода от синтеза белка на синтез ТАГ. Помимо азотного, фосфорного и серного голодания, истощение питательной среды во время роста культуры микроводорослей в целом может быть эффективным для производства липидов. Например, было обнаружено, что общее содержание экстрагируемых липидов может достигать 57,25% при культивировании *C. vulgaris* в условиях истощения питательных веществ в течение 7 дней [11].

В попытке повысить продуктивность липидов важно получить как значительный выход биомассы, так и высокое содержание липидов в клетках микроводорослей. На практике водоросли выращивают в среде с достаточным количеством питательных веществ на ранних стадиях, чтобы получить более высокую концентрацию биомассы как можно быстрее, в то время как голодание по питательным веществам вводится на более поздних стадиях для перепроизводства липидов [36].

#### Солевой стресс

Высокая концентрация соли в окружении может влиять на физиологические и биохимические свойства микроводорослей. Когда клетки микроводорослей подвергаются воздействию солей, запускаются восстановление тургорного давления в клетке, регуляция транспорта ионов через клеточные мембраны и накопление веществ, обуславливающих устойчивость к осмосу [11]. Солевой стресс, создаваемый внутри клеток, приводит к увеличению содержания липидов, что было продемонстрировано на многих видах микроводорослей. Янг и соавторы [48] увеличивали концентрацию NaCl в среде в конце экспоненциальной фазы роста и обнаружили, что содержание липидов в биомассе водоросли *Monoraphidium dybowskii* возрастало до 41,7%. Пал и коллеги [34] исследовали влияние NaCl на рост *Nannochloropsis* sp. и отмечали, что наивысшее содержание общих жирных кислот, равное 47,0% от сухой биомассы, и средняя липидная продуктивность 360 мг общих жирных кислот л<sup>-1</sup> день<sup>-1</sup> достигались при концентрации NaCl 13 г/л. В условиях солевого стресса у *C. vulgaris* выход липидов увеличивался на 21,1% [15].

Выращивание микроводорослей в условиях солевого стресса также может уменьшить вероятность загряз-

нения, контаминации инвазивными и конкурирующими микроорганизмами в микроводорослевых системах, однако слишком высокая концентрация соли подавляет рост и изменяет форму и структуру клеток микроводорослей. Таким образом, необходимо определять оптимальный диапазон солености [11].

#### *Концентрация CO<sub>2</sub> и интенсивность света*

Другие факторы, например, концентрация CO<sub>2</sub> и интенсивность света, также играют важные роли как в накоплении биомассы, так и в образовании липидов в клетках. Литературные данные сообщают, что, как правило, содержания CO<sub>2</sub> в воздухе (0,04%) недостаточно для эффективного роста и синтеза липидов. Ограничение в CO<sub>2</sub> замедляет метаболизм микроводорослей, приводя к снижению накопления липидов, и было отмечено увеличение содержания липидов в *Nannochloropsis* sp. при увеличении концентрации CO<sub>2</sub> с 0,035 до 0,28%. При увеличении концентрации CO<sub>2</sub> с 0,04 (воздух) до 8% постепенно увеличивалось содержание и биомассы и липидов в *Nannochloropsis oculata* [19]. Наибольшее содержание липидов в *Chlorella* sp. отмечается при содержании CO<sub>2</sub> от 2 до 5% [44]. Тем не менее слишком высокие концентрации CO<sub>2</sub> (обычно выше 10%) также могут привести к снижению роста микроводорослей по причине того, что неиспользованный CO<sub>2</sub> в культуре будет трансформироваться в угольную кислоту (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), понижая pH среды. Оптимальную концентрацию CO<sub>2</sub>, таким образом, необходимо определять для каждой культуры отдельно.

Оптимальная интенсивность освещения также видоспецифична. При очень низкой интенсивности света, например, ниже точки компенсации, рост микроводорослей существенно замедляется, что отражается в снижении накопления биомассы и, следовательно, липидов. При увеличении освещенности выше точки компенсации рост микроводорослей улучшается с увеличением интенсивности освещения с максимальной фотосинтетической активностью при достижении точки насыщения светом. То есть, положительный эффект увеличения интенсивности освещения на рост биомассы и выход липидов действует только до определенной точки. Слишком высокая интенсивность света может вызывать фотоингибирование, повреждение микроводорослевых фотосистем и в итоге снижение накопления липидов.

#### *Факторы внешней среды*

Факторы внешней среды, например, температура, также оказывают влияние на рост микроводорослей и образование жирных кислот. Высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот при низких темпе-

ратурах объясняется тем, что клетки вынуждены их вырабатывать для поддержания текучести плазматической мембраны. Другой причиной может быть то, что при низких температурах увеличивается уровень внеклеточного молекулярного кислорода, таким образом усиливая активность десатураз и элонгаз, вовлеченных в биосинтез полиненасыщенных жирных кислот [22].

#### **Получение биоэтанола из углеводов микроводорослей**

Благодаря особенностям метаболизма, в ходе которого возможно накопление в клетке не только липидов, но и углеводов, биомасса микроводорослей может служить для получения этанола, используемого для трансэтерификации липидов или в качестве биотоплива третьего поколения. Виды, относящиеся к родам *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* и *Tetraselmis*, рассматриваются как наиболее подходящие кандидаты для производства биоэтанола, однако его выход зависит от условий культивирования, способа гидролиза и используемой стратегии ферментации [32].

Углеводы накапливаются в клетках зеленых водорослей главным образом в форме крахмала в хлоропластах и полисахаридов клеточной стенки, которые не могут быть непосредственно использованы для производства биоэтанола микроорганизмами. Предварительно необходимо расщепить полисахариды микроводорослей до моносахаридов. Для этого применяют либо химический, либо ферментативный гидролиз. Химический (кислотный) гидролиз с применением серной или соляной кислоты служит наиболее быстрым, простым и дешевым способом. Использование серной кислоты привлекательно также потому, что сульфат-анион является питательным веществом для осуществляющих ферментацию дрожжей. Однако в случае наличия в сырье гемицеллюлоз кислотный гидролиз может приводить к образованию побочных продуктов, ингибирующих процесс ферментативного брожения, таких как фурфурол, 5-гидроксиметилфурфурол, гидроксibenзальдегид и ванилин [12]. Ферментативный гидролиз значительно более медленный и дорогой и при этом требует предварительной обработки биомассы для повышения эффективности гидролиза. Однако выход глюкозы с применением ферментативного расщепления обычно бывает выше, и при этом не образуются ингибирующие брожение побочные продукты [18]. После стадии гидролиза (осахаривания) осуществляется биосинтез спирта с применением бактерий *Zyotomonas mobilis*.

#### **Производство биодизеля**

Традиционный процесс получения биодизеля из биомассы микроводорослей основывается на двух

основных стадиях: экстракции липидов из клетки и конверсии нейтральных липидов в метиловые эфиры жирных кислот (**F**atty **A**cid **M**ethyl **E**sters, FAMEs), то есть, биодизель.

Поскольку микроводоросли имеют относительно жесткую клеточную стенку (в состав которой могут входить и целлюлоза, и хитин, в зависимости от конкретного вида), для эффективного извлечения липидов из клеток необходимо их предварительное разрушение. Существуют различные способы дезинтеграции биомассы микроводорослей, основанные на физических и химических принципах, или использовании ферментов, специфически гидролизующих полисахаридные компоненты клеточной стенки. Основные физические методы — это разрушение клеток микроволновым излучением, ультразвуком, механическое перемалывание в блендере, френч-прессе или с применением стеклянных бусин, а также дезинтеграция клеток посредством теплового шока. К химическим методам относится осмотический шок и кислотный/щелочной лизис. На настоящий момент проведено значительное количество исследований раз-

личных методов дезинтеграции клеток микроводорослей и установлено, что разрушение биомассы микроволновым излучением (СВЧ) представляется самым эффективным, простым, наименее затратным и легко масштабируемым способом [43].

Экстракция липидов из разрушенных или интактных клеток проводится с помощью смеси различных органических растворителей. Наиболее распространен классический метод с использованием смеси хлороформ-метанол 1:1 или 2:1 [8]. Также экстракцию выполняют с применением гексана, диэтилового эфира, петролейного эфира, смесью циклогексан-2-пропанол, ацетон-гексан и дихлорметан-гексан [29].

После экстракции и фракционирования нейтральных липидов осуществляют процесс их трансэтерификации спиртами, такими как метанол, этанол, пропанол или бутанол, с применением серной кислоты в качестве катализатора. Метиловый и этиловый спирт используются наиболее часто. В качестве побочного продукта реакции образуются большие количества глицерина (рис. 1).



Рис. 1. Технологическая схема получения биотоплива в традиционном двухстадийном процессе

В последнее время были разработаны процессы так называемой прямой трансэтерификации *in situ*, преимущество которых заключается в одностадийности (стадии экстракции липидов и трансэтерификации объединены), отсутствии необходимости в разрушении клеток и потребности в большом объеме органических растворителей для экстракции липидов из биомассы, что, на первый взгляд, позволяет существенно улучшить

экономику процесса получения биодизеля. Однако для прямой трансэтерификации требуются большие количества метанола и катализатора — серной кислоты, по сравнению с обычным двухстадийным процессом. Кроме того, затраты, связанные с удалением такого избытка метанола и катализатора, могут перекрыть или существенно снизить достигаемую экономическую выгоду.

Реализация традиционной технологии производства биотоплива в условиях Арктической зоны имеет определенные трудности, связанные с потребностью в больших количествах токсичных летучих органических растворителей, таких как метанол, хлороформ и другие. Все эти компоненты потребуются поставлять в Арктику на регулярной основе для поддержания непрерывного производства биотоплива. Это, в свою очередь, поставит под вопрос автономность указанной системы, равно как и не даст никакого преимущества в полезной нагрузке, поскольку вместо готового топлива необходимо будет обеспечить компоненты для его производства. Следует еще иметь в виду, что производство, связанное с применением и транспортировкой большого количества высокотоксичных летучих веществ, будет создавать серьезную угрозу для экологии. По этим причинам необходим поиск альтернативных решений проблемы топлива в Арктике.

Одним из предполагаемых решений может стать использование липидов микроводорослей не в качестве сырья для производства биотоплива, а напрямую — в качестве топливной добавки, позволяющей увеличить объем топлива до 20–30% и сократить тем самым объем топливных поставок. Кроме того, бензин и дизель служат хорошими растворителями для неполярных соединений, например, нейтральные липиды (свободные жирные кислоты и ТАГ); следовательно, существует потенциальная возможность экстракции липидов из микроводорослей непосредственно самим арктическим дизелем, обходя таким образом необходимость использования иных органических растворителей. Учитывая и тот факт, что микроводоросли способны стабильно расти и синтезировать липиды на отходах жизнедеятельности и промышленности (сточных водах), а не только на специальных питательных средах, открывается возможность создания полностью автономного производства (рис. 2).

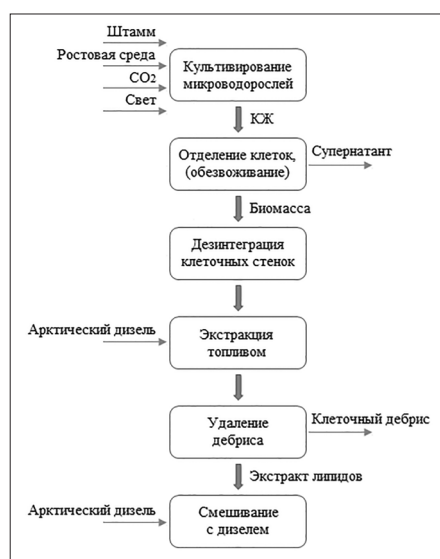


Рис. 2. Технологическая схема получения липидов из биомассы микроводорослей в качестве добавки к арктическому топливу, позволяющей увеличить объем топлива

## Заключение

В данном обзоре были подробно рассмотрены основные технологические аспекты и проблемы, связанные с получением биодизеля третьего поколения посредством культивирования фотосинтезирующих микроводорослей.

Было установлено, что основной проблемой производства биотоплива являются высокая энергозатратность производства и потребность в больших объемах токсичных, относительно не дешевых реагентов для экстракции липидов и их конверсии в биотопливо. В связи с этим была предложена альтернативная концепция решения проблемы топлива в Арктике путем использования липи-

дов микроводорослей в качестве добавки, увеличивающей объем топлива. Разработана технологическая схема, исключающая необходимость использования дополнительных органических растворителей для экстракции липидов из биомассы.

Кроме того, для улучшения экономической составляющей необходимо вести работу в области повышения липидной продуктивности, в связи с чем в статье был дан подробный обзор различных режимов культивирования и существующих методологий увеличения накопления липидов клетками. По причине эффективности, простоты и доступности данного метода наиболее привлекательной выглядит стратегия накопления биомассы на богатой

среде, с последующей индукцией накопления липидов ограничением по источникам азота и фосфора.

## Литература

1. Ковальчук М.В., Нарайкин О.С., Яцишина Е.Б. Природоподобные технологии: новые возможности и новые вызовы // Вестник Российской академии наук. — 2019. — Т. 89. — № 5. — С. 455–465.
2. Ahmad A.L., Yasin N.H.M., Derek C.J.C., Lim J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review // Renew. Sustain. Energy Rev. — 2011. — Vol. 15. — P. 584–593.
3. Al-Widyan M.I., Al-Shyoukh A.O. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel // Bioresour. Technol. — 2002. — Vol. 85. — P. 253–236.
4. Alabi O., Tampier M., and Bibeau E. Microalgae technologies and processes for biofuels/bioenergy production in British Columbia, current technology, suitability and barriers to implementation. Final Report, The British Columbia Innovation Council. — Seed Science Press, 2009.
5. Amin S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae // Energy Conversion Management. — 2009. — Vol. 50. — Issue 7. — P. 1834–1840.
6. Antolin G., Tinaut F.V., Briceno Y. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification // Bioresource Technol. — 2002. — Vol. 83. — P. 111–114.
7. Becker E.W. Microalgae: biotechnology and microbiology. — New York: Cambridge University Press, 1994. — P. 181–182.
8. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. — 1959. — Vol. 37. — No. 8. — P. 911–917.
9. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae — a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // Renew Sustain Energy Rev. — 2010. — Vol. 14. — P. 557–577.
10. Bunyakiat K., Makmee S., Sawangkeaw R., Ngamprasertsith S. Continuous production of biodiesel via transesterification from vegetable oil supercritical methanol // Energy Fuels. — 2006. — Vol. 20. — P. 812–817.
11. Campbell P.K., Beer T., Batten D. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae in ponds // Bioresour. Technol. — 2011. — Vol. 102. — P. 50–56.
12. Cara C., Moya M., Ballesteros I., Negro M.J., González A., Ruiz E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass // Process Biochemistry. — 2007. — Vol. 42. — P. 1003–1009.
13. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // Biotechnol. Adv. — 2007. — Vol. 25. — P. 294–306.
14. Demirbas A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections // Energy Convers. Manage. — 2008. — Vol. 49. — P. 2106–2116.
15. Duan X., Ren G.Y., Liu L.L., and Zhu W.X. Salt-induced osmotic stress for lipid overproduction in batch culture of *Chlorella vulgaris* // African Journal Biotechnology. — 2012. — Vol. 11. — No. 27. — P. 7072–7078.
16. Grobbelaar J.U. Algal culture, from laboratory to commercial production // South African Journal of Botany. — 2007. — Vol. 73. — Issue 2. — P. 289–290.
17. Hirano A., Ueda R., Hirayama S., Ogushi Y. CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation // Energy. — 1997. — Vol. 22. — P. 137–142.
18. Ho S.H., Huang S.W., Chen C.Y., Hasunuma T., Kondo A., Chang J.S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock // Bioresour. Technol. — 2013. — Vol. 135. — P. 191–198.
19. Hsueh H.T., Li W.J., Chen H.H., Chu H. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata* // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2009. — Vol. 95. — P. 33–39.
20. Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium // Enzyme and Microbial Technology. — 2000. — Vol. 27. — No. 8. — P. 631–635.
21. Ito T., Tanaka M., Shinkawa H., et al. Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions // Metabolomics. — 2013. — Vol. 9. — No. 1. — P. 178–187.
22. Jiang Y., Chen F. Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii* // J. Am. Oil Chem. Soc. — 2000. — Vol. 77. — P. 613–617.
23. Krawczyk T. Biodiesel — alternative fuel makes inroads but hurdles remain // INFORM. — 1996. — Vol. 7. — P. 801–829.
24. Lee Y.-K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential // J. Appl. Phycol. — 2001. — Vol. 13. — P. 307–315.
25. Liu S.M., Chen F., Liang S.Z. Researches on the heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris* // J. South China Univ. Technol. — 1999. — Vol. 27. — P. 111–115.
26. Li Y.Q., Horsman M., Wang B., Wu N., Lan C.Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Nannochloris oleoabundans* // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2008. — Vol. 81. — P. 629–636.
27. Luque de Castro M.D., Jimenez-Carmona M.M., and Fernandez-Perez V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants // Trends Anal. Chem. — 1999. — Vol. 18. — No. 11. — P. 708–715.
28. Mandal S. and Mallick N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2009. — Vol. 84. — No. 2. — P. 281–291.
29. Marcelo G., et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the

- Chlorella pyrenoidosa* // Biomass and Bioenergy. — 2011. — Vol. 35. — P. 1533–1538.
30. Mata T.M., Martins A.A., and Caetano N.S. Renew Sustain // Energy Rev. — 2009. — Vol. 43. — No. 14. — P. 217–232.
  31. Miao X.L., Wu Q.Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil // Bioresour. Technol. — 2006. — Vol. 97. — P. 841–846.
  32. Miranda J.R., Passarinho P.C., Gouveia L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production // Bioenergy and Biofuels. — 2012. — Vol. 96. — P. 555–564.
  33. Myers J., Burr G.O. Studies on photosynthesis, some effects of light of high intensity on *Chlorella* // J. Gen. Physiol. — 1940. — Vol. 24. — P. 45–67.
  34. Pal D., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., and Boussiba S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2011. — Vol. 90. — No. 4. — P. 1429–1441.
  35. Park J.B., Craggs R.J., Shilton A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production // Bioresour. Technol. — 2011. — Vol. 102. — P. 35–42.
  36. Přebyl P., Cepák V., Zachleder V. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris* // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2012. — Vol. 94. — No. 2. — P. 549–561.
  37. Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production // Appl. Energy. — 2011. — Vol. 88. — P. 3411–3424.
  38. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.-Y., Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews, Elsevier. — 2014. — Vol. 35. — P. 265–278.
  39. Sato A., Matsumura R., Hoshino N., Suzuki M., and Sato N. Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfurstarvation in *Chlamydomonas reinhardtii* // Frontiers in Plant Science. — 2014. — Vol. 5. — Art. 444. doi: 10.3389/fpls.2014.00444.
  40. Scott S.A., Davey M.P., Dennis J.S., Horst I., Howe C.J., Lea-Smith D.J., et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects // Curr. Opin. Biotechnol. — 2010. — Vol. 21. — P. 1–10.
  41. Sheehan J., Cambreco V., Duffield J., Graboski M., Shapouri H. An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. U.S. Department of agriculture and Energy Report, 1998. — P. 1–35.
  42. Sheehan J.T., Dunahay J., Benemann J.R., and Roessler P.G. Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. CloseOut Report 1998. — P. 34–302.
  43. Silas K., Kwaji H.B., Gutti B. Lipid extraction and transesterification techniques of microalgae — a review // Int. J. Recent Res. Phys. Chem. Sci. — 2015. — Vol. 2. — Issue 1. — P. 26–37.
  44. Vitova M., Bisova K., Kawano S., and Zachleder V. Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications // Biotechnology Advances. — 2015. — Vol. 33. — No. 6. — P. 1204–1218.
  45. Wen Z.Y., Chen F. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* // Enzyme Microbiol. Technol. — 2000. — Vol. 29. — P. 341–347.
  46. Wijffels R.H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology // Trends Biotechnol. — 2008. — Vol. 26. — Issue 1. — P. 26–31.
  47. Xu H., Miao X.L., Wu Q.Y. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters // J. Biotechnol. — 2006. — Vol. 126. — P. 499–507.
  48. Yang H., He Q., Rong J., Xia L., and Hu C. Rapid neutral lipid accumulation of the alkali-resistant oleaginous *Monoraphidium dybowskii* LB50 by NaCl induction // Bioresource Technology. — 2014. — Vol. 172. — P. 131–137.
  49. Yeh K.L., Chang J.S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31 // Bioresour. Technol. — 2012. — Vol. 105. — P. 120–127.
  50. Zhu L.D., Li Z.H., and Hiltunen E. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock // BioMed Research International. — 2016. — Art. 8792548. doi: 10.1155/2016/8792548.

## References

1. Koval'chuk MV, Naraykin OS, Yatsishina YeB. Prirodopodobnyye tekhnologii: novyye vozmozhnosti i novyye vyzovy. Vestnik Rossiyskoy akademii nauk 2019; 89(5):455–465 (in Russian).
2. Ahmad AL, Yasin NHM, Derek CJC, Lim JK. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. Renew Sustain Energy Rev 2011; 15:584–593.
3. Al-Widyan MI, Al-Shyoukh AO. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. Bioresour Technol 2002; 85:253–236.
4. Alabi O, Tampier M, and Bibeau E. Microalgae technologies and processes for biofuels/bioenergy production in British Columbia, current technology, suitability and barriers to implementation. Final Report, The British Columbia Innovation Council. Seed Science Press, 2009.
5. Amin S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. Energy Conversion Management 2009; 50(7):1834–1840.
6. Antolin G, Tinaut FV, Briceno Y. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. Bioresource Technol 2002; 83:111–114.
7. Becker EW. Microalgae: biotechnology and microbiology. New York: Cambridge University Press, 1994: 181–182.



8. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37(8):911–917.
9. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustain Energy Rev* 2010; 14:557–577.
10. Bunyakiat K, Makmee S, Sawangkeaw R, Ngamprasertsith S. Continuous production of biodiesel via transesterification from vegetable oil supercritical methanol. *Energy Fuels* 2006; 20:812–817.
11. Campbell PK, Beer T, Batten D. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae in ponds. *Bioresour Technol* 2011; 102:50–56.
12. Cara C, Moya M, Ballesteros I, Negro MJ, González A, Ruiz E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry* 2007; 42:1003–1009.
13. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 2007; 25:294–306.
14. Demirbas A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers Manage* 2008; 49:2106–2116.
15. Duan X, Ren GY, Liu LL, and Zhu WX. Salt-induced osmotic stress for lipid overproduction in batch culture of *Chlorella vulgaris*. *African Journal Biotechnology* 2012; 11(27):7072–7078.
16. Grobbelaar JU. Algal culture, from laboratory to commercial production. *South African Journal of Botany* 2007; 73(2):289–290.
17. Hirano A, Ueda R, Hirayama S, Ogushi Y. CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy* 1997; 22:137–142.
18. Ho SH, Huang SW, Chen CY, Hasunuma T, Kondo A, Chang JS. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour Technol* 2013; 135:191–198.
19. Hsueh HT, Li WJ, Chen HH, Chu H. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2009; 95:33–39.
20. Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 27(8):631–635.
21. Ito T, Tanaka M, Shinkawa H, et al. Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics* 2013; 9(1):178–187.
22. Jiang Y, Chen F. Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga *Cryptocodinium cohnii*. *J Am Oil Chem Soc* 2000; 77:613–617.
23. Krawczyk T. Biodiesel – alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *INFORM* 1996; 7:801–829.
24. Lee Y-K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *J Appl Phycol* 2001; 13:307–315.
25. Liu SM, Chen F, Liang SZ. Researches on the heterotrophic culture of *Chlorella vulgaris*. *J South China Univ Technol* 1999; 27:111–115.
26. Li YQ, Horsman M, Wang B, Wu N, Lan CQ. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008; 81:629–636.
27. Luque de Castro MD, Jimenez-Carmona MM, and Fernandez-Perez V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal Chem* 1999; 18(11):708–715.
28. Mandal S and Mallick N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009; 84(2):281–291.
29. Marcelo G, et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy* 2011; 35:1533–1538.
30. Mata TM, Martins AA, and Caetano NS. *Renew Sustain Energy Rev* 2009; 43(14):217–232.
31. Miao XL, Wu QY. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol* 2006; 97:841–846.
32. Miranda JR, Passarinho PC, Gouveia L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. *Bioenergy and Biofuels* 2012; 96:555–564.
33. Myers J, Burr GO. Studies on photosynthesis, some effects of light of high intensity on *Chlorella*. *J Gen Physiol* 1940; 24:45–67.
34. Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, and Boussiba S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 90(4):1429–1441.
35. Park JB, Craggs RJ, Shilton AN. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour Technol* 2011; 102:35–42.
36. Příbyl P, Cepák V, Zachleder V. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012; 94(2):549–561.
37. Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl Energy* 2011; 88:3411–3424.
38. Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier P-Y, Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier 2014; 35:265–278.
39. Sato A, Matsumura R, Hoshino N, Tsuzuki M, and Sato N. Responsibility of regulatory gene expression and repressed protein synthesis for triacylglycerol accumulation on sulfur-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Frontiers in Plant Science* 2014; 5:444. doi: 10.3389/fpls.2014.00444.

40. Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21:1–10.
41. Sheehan J, Cambreco V, Duffield J, Graboski M, Shapouri H. An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles. US Department of agriculture and Energy Report, 1998: 1–35.
42. Sheehan JT, Dunahay J, Benemann JR, and Roessler PG. Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. *CloseOut Report* 1998: 34–302.
43. Silas K, Kwaji HB, Gutti B. Lipid extraction and transesterification techniques of microalgae – a review. *Int J Recent Res Phys Chem Sci* 2015; 2(1):26–37.
44. Vitova M, Bisova K, Kawano S, and Zachleder V. Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances* 2015; 33(6):1204–1218.
45. Wen ZY, Chen F. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Enzyme Microbiol Technol* 2000; 29:341–347.
46. Wijffels RH. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol* 2008; 26(1):26–31.
47. Xu H, Miao XL, Wu QY. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol* 2006; 126:499–507.
48. Yang H, He Q, Rong J, Xia L, and Hu C. Rapid neutral lipid accumulation of the alkali-resistant oleaginous *Monoraphidium dybowskii* LB50 by NaCl induction. *Bioresource Technology* 2014; 172:131–137.
49. Yeh KL, Chang JS. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresour Technol* 2012; 105:120–127.
50. Zhu LD, Li ZH, and Hiltunen E. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. *BioMed Research International* 2016; 8792548. doi: 10.1155/2016/8792548.

## CURRENT STATE OF BIOFUEL PRODUCTION FROM MICROALGAE BIOMASS

P.K. ПОТАПОВ, I.V. МАРКИН, I.A. ЗАЙЦЕВ

*Federal State Autonomous Institution «Military Innovative Technopolis «ERA», Anapa, Russia*

To date, the problem of exhaustion of non-renewable sources of raw materials for the production of traditional fuels is a key driver in the search for alternative energy sources. Global warming and climate change are also pushing humanity to look for more environmentally friendly fuels in terms of production and use. Against this background, in recent decades, both in Russia and around the world, there has been an increased interest in the production of third-generation biofuels using green microalgae that can grow on affordable and cheap food and municipal waste. In addition, the development of technology for producing biodiesel and bioethanol from biomass can be a potential basis for creating autonomous isolated complexes, including military cities that do not depend on external fuel supplies, which is extremely important for hard-to-reach areas of our vast country and the Arctic.

*Keywords:* biofuel, bioethanol, biodiesel, microalgae, alternative energy.

### Address:

Zaitsev I.A.

junior researcher, Federal State Autonomous Institution

«Military Innovative Technopolis «ERA», Anapa

E-mail: era\_otd2@mil.ru

### Для цитирования:

П.К. Потапов, И.В. Маркин, И.А. Зайцев Современное состояние производства биотоплива из биомассы микроводорослей. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):79–90.

### For citation:

Potapov P.K., Markin I.V., Zaitsev I.A. Current state of biofuel production from microalgae biomass. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(3):79–90 (in Russian).

УДК 579.843.1:57.086.835:611

## ПРИМЕНЕНИЕ ЛИНИЙ КЛЕТОК КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА В ИССЛЕДОВАНИИ *VIBRIO CHOLERAЕ*

О.А. ЯКУШЕВА\*, Л.П. АЛЕКСЕЕВА, В.В. ЕВДОКИМОВА, В.П. ЗЮЗИНА, Д.И. СИМАКОВА

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

В обзоре представлены данные о клеточных линиях кишечника человека, которые применяют как альтернативу биомоделям для получения новых сведений о холерных вибрионах. Рассмотрены линии и их клоны, наиболее часто применяемые для изучения молекулярных механизмов взаимодействия холерных вибрионов с клетками энтероцитов.

**Ключевые слова:** клеточные линии, *Vibrio cholerae*, адгезия, холерный токсин, дополнительные токсины, цитотоксичность.

### Введение

В настоящее время накоплено много сведений, касающихся эпидемиологии, микробиологии, диагностики и профилактики возбудителя холеры. Тем не менее до сих пор многие вопросы, касающиеся патогенеза, остаются нерешенными. Для изучения и лучшего понимания механизмов, лежащих в основе взаимодействия между *Vibrio cholerae* и энтероцитами, а также оценки цитотоксического действия токсинов, продуцируемых вибрионами, используют лабораторных животных [1]. Модель *in vivo* воспроизводит комплексность поражения *V. cholerae*, однако межвидовые фенотипические различия метаболизма и отличия в анатомии животных — морфологическое строение желудка и формы ворсинок тонкой кишки — не всегда позволяют экстраполировать результаты на человека [3]. Кроме того, в последнее время большое внимание уделяется соблюдению этических принципов исследований в рамках концепции 3R (Reduction, Refinement, Replacement): уменьшение количества тестируемых животных, модификация методик, направленная на минимизацию страдания и стресса у животных, и предпочтительное тестирование на моделях *in vitro* [4, 10]. Культура клеток как модельная система направлена на минимизацию количества подопытных

животных, а также полную их замену. Преобладающее число публикаций посвящено тому, что для изучения молекулярных механизмов взаимодействия *V. cholerae* с кишечным эпителием человека больше подходят модели *in vitro*, чем классические модели на грызунах [28, 29, 41].

Преимущества работы с клеточными культурами связаны со следующими факторами: с возможностями использования коллекционных паспортизированных линий клеток с известными свойствами; изучением характера биологической активности тестируемых соединений непосредственно на клеточном уровне; возможностью оценки состояния клеток-мишеней «прижизненно», а не «post factum»; одновременным тестированием большого числа биологически активных биополимеров при их минимальном расходе; получением результатов тестирования в течение относительно короткого промежутка времени; возможностью определения точной концентрации потенциально токсичного вещества, воздействующего на клетки индикаторной культуры и вызывающего тот или иной эффект [2, 3].

Исследование свойств холерных вибрионов культуральным методом ведется с 1970-х годов. Клеточные линии карциномы толстой кишки человека, проявляющие функции и структурные свойства зрелых энтероцитов или бокаловидных клеток, были созданы для изучения патогенеза энтеротоксигенных бактерий. При полной дифференцировке клетки имеют поляризованную организацию, образуют соединительные плотные контакты (TJ — tight junctions), созданные взаимодействием трансмембранных белков клаудина и окклюдина с актиновым цитоскелетом через белки плотных соединений окклюденой зоны (zonula occludens — ZO), и формируют клеточный

© 2022 г. Якушева О.А., Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Зюзина В.П., Симакова Д.И.

\* Автор для переписки:

Ольга Александровна Якушева  
научный сотрудник лаборатории диагностических препаратов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
E-mail: yakusheva\_oa@antiplague.ru

монослой, который физически и функционально имитирует кишечный эпителиальный барьер. Повреждение этих соединений способствует воспалительному ответу при проникновении антигена. Эти соединения также регулируют селективную параклеточную проницаемость для растворенных веществ, ионов, воды и различных макромолекул.

Клеточные линии используют для исследований *in vitro* адгезивных свойств *V. cholerae*, для изучения взаимодействия энтероцитов с белковыми и липополисахаридными субстанциями, везикулами вибрионов. Культура клеток до настоящего времени является единственным методом в условиях *in vitro*, позволяющим оценить биологическую активность токсина, изучить факторы, препятствующие его адгезии на поверхности эпителиальной клетки, а также механизмы его интернализации и внутриклеточного превращения [33].

Цель работы — осуществить обзор данных литературы о клеточных линиях кишечного эпителия человека, используемых *in vitro* для изучения холерных вибрионов.

### Клеточная линия HT-29

В 1964 г. J. Fogh выделил из толстой кишки женщины и культивировал в условиях *in vitro* клетки аденокарциномы толстой кишки. Родительская клеточная линия рака толстой кишки HT-29 состоит в основном из недифференцированных клеток, в то время как дифференцированные клетки составляют от 3 до 5% от общего числа в популяции [17]. Линия клеток HT-29 дала начало нескольким субпопуляциям со свойствами клеток тонкой кишки. Первую энтероцитоподобную популяцию HT-29 Cal<sup>+</sup> селекционировали в культуральной среде, после замены в ней глюкозы на галактозу. Вторая энтероцитоподобная субпопуляция HT-29 Glc<sup>-</sup> была выделена в результате культивирования в среде без глюкозы. Пассирование клеток субпопуляции HT-29 Glc<sup>-</sup> в глюкозосодержащей среде позволило получить дифференцированные субконфлюэнтные клетки HT-29 Rev Glc<sup>+/-</sup>. Аналогичным путем были отобраны другие энтероцитоподобные субпопуляции, такие как HT-29-D4, HT29.74 и HT-29-18-C1.

Из родительской клеточной линии HT-29 также созданы две постоянно дифференцированные клональные клеточные линии. Линия HT29.19E получена в результате обработки родительской линии HT-29 бутиратом натрия, клон HT29.13 выделен после расщепления аденозина с применением аденозиндезаминазы. Все энтероцитоподобные субпопуляции клеток HT-29

или клеточные клоны имели плотные соединительные контакты, хорошо выраженные апикальные поверхности, покрытые многочисленными микроворсинками, называемые щеточной каемкой, и базолатеральные домены, отвечающие за всасывание питательных веществ, что свойственно клеткам тонкой кишки. Энтероциты в ответ на воздействие продуцировали цитокины, такие как интерлейкин-4 (ИЛ-4) и ИЛ-13, фактор некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ), ИЛ-1 и ИЛ-8 [33].

Важнейшая роль в патогенности холерных вибрионов принадлежит факторам адгезии, обеспечивающим колонизацию тонкой кишки [7]. К ним относится целый ряд связанных с клеткой пилинов: Сер (core encoded pilin), токсин-корегулируемые пили адгезии TSP, белки внешней мембраны OmpU, а также другие адгезивные молекулы, включающие в себя флагеллин, Mam7, GbrA, FrhA и дополнительные факторы колонизации, кодируемые acfA, acfB, acfC, acfD. Повышение адгезивной активности может обеспечиваться нейраминидазой NanH [6], высокомолекулярным цитотоксином MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin) [5] и гемолизинем HlyA [8].

При использовании недифференцированных родительских клеток HT-29 выяснили, что очищенные жгутики и секретлируемые белки флагеллина, FlaC и FlaD, *V. cholerae* индуцируют продукцию IL-8 через Toll-подобный рецептор — TLR5 в энтероцитах [46]. Также показано, что белок внешней мембраны OmpU, являющийся одним из основных поринов *V. cholerae*, играет важную роль в воспалении кишечника, индуцируя экспрессию IL-8 на уровне мРНК и белка в линии эпителиальных клеток кишечника человека. При этом только апикальное воздействие OmpU индуцирует секрецию IL-8 в поляризованных клетках HT-29. В опосредованной OmpU гибели клеток решающую роль играют митохондрии. Белок OmpU перемещается в митохондрии и непосредственно инициирует модификации проницаемости мембран, а также высвобождает факторы, индуцирующие апоптоз [47].

В 1991 г. Zeta Charania et al. предложили культуру клеток HT-29, выращенную в среде, содержащей 17 мМ глюкозы, в качестве индикаторной линии для тестирования холерного токсина (ХТ), который является основным фактором вирулентности (и эпидемической значимости) холерных вибрионов, определяющий тяжесть заболевания при холере [19].

Особый интерес представляют данные, полученные Shamila Sarwar et al., при изучении возможности использования в лечении холеры наночастиц оксида

цинка в качестве альтернативы антибиотикам. Для понимания механизма действия оксида цинка на активность холерного токсина использовали богатые ганглиозидными рецепторами GM1 клетки HT-29 и штаммы *V. cholerae* Classical O395 и *V. cholerae* El Tor C6706, продуцирующие холерный токсин. В результате было показано, что оксид цинка в дозе 10 мкг/мл не влиял на скорость роста этих двух штаммов и не снижал уровни экспрессии мРНК и холерного токсина. Однако оксид цинка образовывал комплекс с холерным токсином и нарушал его вторичную структуру, тем самым предотвращая первую стадию транслокации его в эпителиальные клетки кишечника, не оказывая заметного токсического действия на культуру HT-29 [42].

Применение линии HT-29 позволило изучить интернализацию холерного токсина, ассоциированного с везикулами наружной мембраны, и определить, что кавеолин-опосредованный эндоцитоз является доминирующим путем транспорта везикул в клетку [49]. С помощью культуры клеток HT-29 было выяснено, что провоспалительный ответ индуцируется везикулами *V. cholerae* O395 путем, зависимым от NOD1 (домен олигомеризации нуклеотидов) [20].

Исследования в отношении некультивируемых форм остаются в центре внимания специалистов, так как в эндемичных по холере районах с регулярными эпидемическими проявлениями при ПЦР-исследовании воды открытых водоемов могут выявляться холерные вибрионы, которые не обнаруживаются с помощью бактериологических методов. В связи с этим одним из актуальных вопросов остается реверсия некультивируемых форм холерных вибрионов в культивируемое состояние. Mitsutoshi Senoh et al. наблюдали реверсию некультивируемых форм *Vibrio cholerae* при совместном культивировании с культурой клеток HT-29 [43]. Авторы полагают, что каталаза, продуцируемая культурой клеток HT-29 в среду культивирования, играет ключевую роль в этом процессе [44].

Кроме вышеописанных субпопуляций, из родительской клеточной линии HT-29 было отобрано несколько секретирующих слизь клонов. После обработки бутиратом натрия из родительской клеточной линии HT-29 возникла перманентно дифференцированная клональная клеточная линия HT-29.cl16E, секретирующая муцин. Вторая клональная линия HT29-SB, продуцирующая муцин, отобрана аналогичным образом. При выращивании родительской линии HT-29 в среде, не содержащей глюкозу, было отмечено появление гомогенных столбчатых клеток с типичной морфологией

бокаловидных клеток, которые были обозначены как клон HT29-18N2. В результате проведенных экспериментов с летальными концентрациями метотрексата (MTX) и 5-фторурацила (FU) было показано, что адаптация родительской клеточной линии HT-29 к ним приводит к появлению стабильно детерминированной субпопуляции клеток. При этом линия клеток HT29-MTX представляет собой гомогенную субпопуляцию бокаловидных клеток, секретирующих слизь и муцины тонкой и толстой кишки с иммунореактивностью. Муцины, экспрессируемые этой линией, бывают как секреторные: MUC2, MUC5AC, MUC6, — так и мембраносвязывающие — MUC1, MUC3, MUC4. В то же время клетки линии HT29-FU дифференцированы и состоят из энтероцитоподобных клеток и беспорядочно распределенных секретирующих муцин MUC2 и MUC4 клеток [33].

С использованием полностью дифференцированных секретирующих слизь клеток HT-29-18 N2 исследовали адгезию *V. cholerae*. Для изучения интернализации холерного токсина в клетки применяли также клон HT-29-18 N2 [32]. С помощью клеточной линии HT-29, секретирующей слизь, было обнаружено, что хитин-связывающий белок GbpA *V. cholerae* отвечает за прикрепление к кишечнику человека. Связывание *V. cholerae* с муцином с помощью этого белка приводит к зависимой от ядерного транскрипционного фактора карраВ (NF-κB) активации генов MUC2, MUC3 и MUC5AC и, как следствие, к увеличению выработки слизи, которая привлекает больше бактерий. Взаимодействие GbpA с клетками вызывает накопление активных форм кислорода, приводящих к дисфункции митохондрий, перемещению NF-κB в ядро и некротическому ответу клеток-хозяев.

Как видно из вышеизложенного, клеточная линия HT-29 широко используется в экспериментальной работе по холере, в частности, при изучении адгезивных свойств холерных вибрионов, продукции цитокинов в ответ на воздействие биологически активных веществ, интернализации холерного токсина с везикулами внешней мембраны, возможности реверсии некультивируемых форм в исходное состояние.

### Клеточная линия Caco-2

Клеточная линия Caco-2 была получена из кишечника мужчины в 1970 г. J. Fogh после 14 пассажей в питательной среде колоректальной аденокарциномы. Клетки Caco-2 могут либо функционировать как не-

дифференцированные клетки толстой кишки, либо самопроизвольно дифференцироваться в фенотип, подобный тонкой кишке с энтероцитоподобными абсорбционными свойствами. Из этой линии на ранних и поздних пассажах родительских клеток Сасо-2 выделены клоны, такие как клон 40, клоны от Сасо-2/1 до Сасо-2/16, клоны Сасо-2ВВе 1 и Сасо-2ВВе 2 (также обозначаемые как С2ВВе 1 и С2ВВе 2), клон cl1, клон Сасо-2/AQ, клон NGI3, клоны 1, 20 и 21, Сасо/B7 и клоны NCL1 to — 12. Кроме того, из пассажа 29 получено 8 клонов, а из 198 пассажа — 18 клонов, включая часто используемый клон Сасо-2/ТС7.

Полностью дифференцированные клетки Сасо-2 и клоны Сасо-2, несмотря на то, что имеют происхождение из толстой кишки, экспрессируют апикальные и базолатеральные белки и проявляют специфические функции зрелых энтероцитов тонкой кишки. В культуре полностью дифференцированная родительская клеточная линия Сасо-2 и её клоны образуют клеточный монослой, имитирующий кишечный эпителиальный барьер. Процесс дифференцировки в культуре клеток Сасо-2 начинается в момент слияния, когда клетки перестают делиться.

Клетки Сасо-2 экспрессируют плотные контакты, микроворсинки и ряд ферментов, характерных для энтероцитов, таких как пептидазы, эстеразы, а также переносчики захвата аминокислот, жёлчных кислот, карбоновых кислот и Р-гликопротеин. Клетки Сасо-2 экспрессируют функциональные Toll-подобные рецепторы, которые могут реагировать на бактериальное заражение [17].

Родительские клетки и клоны Сасо-2 представляют собой наилучшую модель для изучения поляризации клеток, которая развивается после полного слияния в культуру, экспрессируют хорошо организованный и регулируемый домен межклеточного соединения, включающий соединительные плотные контакты, образованные с белками окклюденсой зоны — ZO-1, ZO-2 и ZO-3, окклюдинами и клаудином-1, -2, -3, -4, -12, но не клаудином-5. В некоторых работах описано, что клетки Сасо-2 содержат гены MUC, MUC1F, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5B, ответственные за продукцию соответствующих муцинов. Полностью дифференцированный клон NCL2, выделенный из родительской клеточной линии Сасо-2, характеризуется гомогенностью клеток, апикально секретирующих гликокаликс-подобный или муцин-подобный материал [33].

Дифференцированные клетки Сасо-2 использовали для изучения адгезии штамма *V. cholerae*, не отно-

сящегося к O1 серогруппе. В результате было показано, что штамм NRT36S прикрепляется к микроворсинкам [38]. Также на этой модели клеток было выявлено ингибирующее действие на адгезию *V. cholerae* цинка, селена, марганца [15]. В другом исследовании с этой же клеточной линией отмечено, что для адгезии и прикрепления к щётчатой кайме штаммы *V. cholerae* используют белок внешней мембраны OmpU [45]. Культура клеток Сасо-2 помогла выявить роль фактора колонизации TsrF в прикреплении TSP-пилей холерного вибриона к эпителиальным клеткам [31]. В результате инфицирования *V. cholerae* полностью дифференцированной линией Сасо-2 в клетках активируются два переносчика аминокислот — SLC7A11 и SLC6A14 и подавляется пять переносчиков: AQP10 (член семейства трансмембранных белков водных каналов, который переносит воду, а также глицерин и другие растворенные молекулы), Mg-канал (рецептор катионного канала подсемейства M член 6 TRPM6), SERT (переносчик серотонина, контролирующий поглощение серотонина, участвующий в кишечной абсорбции и секреции электролитов и жидкостей), SVCT1 (транспортер витамина C) и ZnT4 (транспортер цинка), имитируют ситуацию у инфицированных пациентов [33].

После воздействия на дифференцированные клетки Сасо-2 холерным токсином в них наблюдалась повышенная экспрессия фактора ускорения распада (DAF) и  $\alpha$ 1-антихимотрипсина, что соответствовало реакции слизистой оболочки кишечника во время острой холеры [21]. Кроме того, холерный токсин транскрипционно подавлял экспрессию антимикробного пептида LL-37 и  $\beta$ -дефензина (HBD-1) в полностью дифференцированных клетках Сасо-2 путем активации протеинкиназы A [18].

Применение культуры клеток позволило оценить пробиотические свойства *Lactobacillus acidophilus* на прикрепление и взаимодействие *V. cholerae* с эпителиальными клетками Сасо-2. В результате было показано, что *L. acidophilus* предотвращал адгезию *V. cholerae* и снижал экспрессию фактора некроза опухоли- $\alpha$  и интерлейкина-8 в клетках-хозяевах [12]. В другой работе, выполненной на модели Сасо-2, установлено, что *L. acidophilus* достаточно эффективен для применения в качестве дополнительного лечения и снижения продукции токсина при острой инфекционной диарее, вызванной *V. cholerae* [13].

Клиническая картина типичной холеры обусловлена, главным образом, холерным токсином, но в её развитии участвует и ряд других факторов [9].

«Кассета вирулентности» *V. cholerae* включает гены, кодирующие холерный токсин и *Zonula occludens*

(Zot), а также третий токсин, называемый Accessory *Cholerae enterotoxin* (Ace) [40]. Исследование рецептора эпителиальных клеток для токсина Zot *V. cholerae* в полностью дифференцированных клетках Caco-2 выявило мембранный белок массой 66 кДа, локализованный в межклеточных контактах. В результате было найдено, что для связывания Zot с его рецептором необходима последовательность, которая располагается между аминокислотами 118 и 299. В полностью дифференцированных монослоях клеток Caco-2 фрагмент Zot с молекулярной массой 12 кДа обладал биологической активностью, которая выражалась в увеличении параклеточной проницаемости. В соответствии с этим, С-концевой домен Zot вызывал делокализацию окклюдина и парного каркасного цитозольного белка ZO-1 из соединительных плотных контактов полностью дифференцированных монослоев клеток Caco-2, не вызывая реорганизации F-актина или каких-либо изменений в трансэпителиальном электрическом сопротивлении [25]. Более того, активный домен Zot (аминокислотные остатки от 288 до 293) увеличивал фосфорилирование серина / треонина цитозольного каркасного белка ZO-1 и миозина, изменяя взаимодействие между каркасным цитозольным белком ZO-1 и его рецепторами по связыванию, что, в свою очередь, вызывало разрушение соединительных плотных контактов посредством протеиназо-активированного рецептора (PAR2). Было отмечено, что зонулин — эукариотический белок, структурно сходный с Zot, индуцировал разрушение соединительных плотных контактов, что приводило к делокализации каркасного цитозольного белка ZO-1 в полностью дифференцированных клетках Caco-2 [39]. Е.В. Монахова предложила использовать культуру клеток Caco-2 в качестве индикаторной линии для тестирования Zot *in vitro* [7].

В культуре клеток Caco-2, образующей дифференцированный поляризованный монослой, под действием гемагглютинин/протеазы (НА/Р) наблюдался класматоз на апикальной поверхности [11]. Последняя расщепляла трансмембранный белок окклюдин на два фрагмента, в результате связанный с ним каркасный цитозольный белок ZO-1 терял связь с цитоплазматической мембраной. Однако это не приводило к разрушению плотных контактов. Вместо этого как в культуре клеток кишечника, так и в кишечнике *in vitro* наблюдалось расширение межклеточных промежутков ниже окклюденовой зоны, вероятно, в области адгезивных контактов, а апикальные части клеток оставались соединенными. Возможно, это связано с сохранением внеклеточных доменов окклюдина либо с другим компонентом плотных

контактов — белками-клаудинами, действие НА/Р на которые ещё не изучалось [8].

Появление больших внутриклеточных вакуолей, демонстрирующих признаки аутофагосом, и индуцированная аутофагия в эпителиальных клетках, включая недифференцированные клетки Caco-2, в результате действия гемолитического экзотоксина, известного как VCC, является реакцией выживания клеток [26]. Токсин Cholix — АДФ-рибозилирующий цитотоксин *V. cholerae* использует эукариотический фактор элонгации 2 в качестве субстрата, подобно дифтерийному токсину и экзотоксину А псевдомонад, и способствует каспазо-зависимому апоптозу в клетках HeLa, но не в клетках Caco-2 [35, 36].

Связывание и проникновение *V. cholerae*, нахождение бактерий в интраэпителиальном кармане, содержащем лимфоцит, а также бактериальная транслокация из М-подобных клеток человека изучены с использованием модели сокультивирования М-подобных клеток, включающей клетки из мышей BALB/c (РР-лимфоциты) и родительских полностью дифференцированных клеток Caco-2 или клеток клона Caco-2 cl1 [30]. Взаимодействие *V. cholerae* и секреторного рецептора IgA, совместно локализующегося с ганглиозидом GM1 рецептора холерного токсина, охарактеризовано с использованием модели сокультивирования М-подобных клеток, состоящих из клеток Raji (В-лимфоциты человека) и родительских, полностью дифференцированных Caco-2 [16]. В результате было установлено, что способность бактерий взаимодействовать с GM1 обусловлена наличием холерного токсина и играет критическую роль в транзитозе *V. cholerae* М-клетками. Более того, было констатировано, что связывание *V. cholerae* и транцитоз в М-подобных клетках зависят от жизнеспособности бактерий, поскольку тепловая обработка бактерий вызывает потерю связывания с GM1, что коррелирует со значительным снижением поглощения и транцитоза. Важно отметить, что бактерии *V. cholerae* обнаруживаются только прикрепленными к щеточной кайме полностью дифференцированных клеток Caco-2, тогда как внутриклеточная локализация вибрионов не была отмечена ни в одной из модельных систем [30]. В качестве интерактивной модели, имитирующей кишечную среду, для определения роли TsrA в продукции муцина и его регулирующего действия на молекулы врожденного иммунитета, использовали совместное культивирование культуры клеток Caco-2 и мононуклеарных клеток периферической крови. В результате было показано, что TsrA стимулировал экспрессию генов MUC3 и MUC4,

а также выработку NOD2, что соответствовало провоспалительным реакциям, наблюдаемым при холере [31]. Также TsrA увеличивал синтез молекул адгезина CEACAM1 и провоспалительных цитокинов IL-1, IL-8 и TNF- $\alpha$  клетками Caco-2 [24].

Таким образом, клетки Caco-2 относят к числу линий, на которых представляется возможным детальное изучение адгезии, пробиотических свойств лактобактерий на прикрепление *V. cholerae* к клеткам эпителия, а также тестирования токсинов.

### Клеточная линия T84

Подобно Caco-2 и HT-29, клетки T84 были получены из клеток рака толстой кишки человека. Однако, в отличие от первых двух линий, клетки T84 были выделены из метастазированных клеток, обнаруженных в легких. При культивировании клетки должны поддерживаться при высокой плотности. В монослое клетки сильно поляризованы, с короткими микроворсинками на апикальной мембране, обращенные к среде, имеют базолатеральную мембрану, а также соединительные плотные контакты и десмосомы между соседними клетками. В клетках T84 описаны гены MUC1, MUC2, MUC3 и MUC5AC, а также регуляторы экспрессии генов их продукции. Примечательно, что в отличие от клеточных линий HT-29 и Caco-2, до сих пор не было выявлено ни одного клона или субпопуляции из родительской клеточной линии T84. Полностью дифференцированные клетки экспрессировали функциональные кишечные белки человека на щеточной каёмке.

Клеточная линия, находящаяся в камерах Уссинга, представляет собой превосходную модельную систему для изучения процессов транспорта электролита и функций потенциалзависимых каналов с помощью анализа электрических цепей и мембрано-ассоциированных векторных клеточных транспортных систем. Полностью дифференцированные клетки T84 использовали для исследования регуляции секреции хлоридов, транспорта Na/K, изучения Na-независимых нуклеозидных переносчиков (ENT1 и ENT2) и хлоридного канала трансмембранного регулятора проводимости при муковисцидозе. Для клеток T84 характерен высокий уровень трансэпителиального электрического сопротивления, который характеризует жизнеспособность клеток [17]. Клетки T84 являются лучшей моделью для изучения влияния энтеровирулентных бактериальных патогенов и бактериальных токсинов, влияющих на структурную организацию плотных контактов и транспортные функ-

ции соединительных плотных контактов клетки толстой кишки человека, а также для изучения трансмиграции полиморфноядерных лейкоцитов через кишечный барьер и возникающие в результате последствия [33].

Клетки T84 были использованы для изучения связывания энтеротоксина, активации гуанилатциклазы и продукции циклического аденозин монофосфата (цАМФ) с целью получения новой информации о механизме его действия. Холерный токсин проникает в полностью дифференцированные клетки T84 через апикальные, но не базолатеральные мембраны. Установлено, что интернализация холерного токсина в дифференцированных клетках идет в основном через caveолярные пути, тогда как в незрелых — в основном через клатриновые пути, при этом последние отвечают на регуляцию кортикостероидами. После закрепления токсина на поверхности клетки начинается инвагинация и интернализация определённых мембранных областей с формированием гладких эндоцитозных пузырьков, которые транспортируют токсин к аппарату Гольджи.

Связывание субъединиц токсина В с ганглиозидом GM1, локализованным в мембранах микроворсинок полностью дифференцированных клеток T84, сопровождается транслокацией ферментативно активной субъединицы А через мембрану, а затем ретроградным движением в клетке и последующей активацией аденилатциклазы цАМФ, расположенной на базолатеральной мембране. Ферментативно активная субъединица А холерного токсина на терминальном конце имеет последовательность KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu), обеспечивающую её движение от аппарата Гольджи к эндоплазматическому ретикулуму, взаимодействует непосредственно с эндогенными рецепторами KDEL в полностью дифференцированных клетках T84 и подвергается ретроградному движению через цистерны Гольджи и эндоплазматический ретикулум для обеспечения биологической активности. Антитела, направленные против холерного токсина, ингибируют связывание токсина с апикальными клеточными мембранами полностью дифференцированных клеток T84 [39].

Токсин MARTXvc (multifunctional autoprocessing RTX), продуцируемый штаммами *V. cholerae* El Tor и O139, но не классическими штаммами, деполимеризует клеточный актин на мономеры, вызывает потерю трансэпителиального электрического сопротивления в полностью дифференцированных клетках T84 при добавлении к апикальной или базолатеральной поверхности клеток. Биологическая активность MARTXvc выражается в снижении трансэпителиального сопротивления в монослое T84 и повреждении клетки [22, 40].



Токсин Ace *V. cholerae* стимулирует быстрое увеличение разности потенциалов мембраны и активацию Cl<sup>-</sup>/HCO<sup>3-</sup> транспортёров в полностью дифференцированных клетках Т84 в результате изменений внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, но это не связано с каким-либо увеличением внутриклеточных циклических нуклеотидов. Снижение трансэпителиального электрического сопротивления также наблюдалось в полностью дифференцированных клетках Т84 в результате активности протеазы холерных вибрионов.

*V. cholerae* считается прототипом невоспалительной инфекции, при этом встречаются сообщения о врожденных иммунных ответах, таких как выработка провоспалительных цитокинов и экспрессия бактерицидных белков. В частности, продукция IL-8, индуцированная *V. cholerae*, в полностью дифференцированных клетках Т84 активирует адаптивный иммунный ответ и может обеспечить защиту от последующих заболеваний. Индуцированная флагеллином TLR5-зависимая продукция IL-8 в полностью дифференцированных клетках Т84 развивается за счет активации митоген-активируемой протеинкиназы и ядерного транскрипционного фактора карраВ [27]. Повышенная продукция IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 и MCP-1 была обнаружена в клетках Т84, инфицированных *V. cholerae*, в то же время в инфицированных полностью дифференцированных клетках Caco-2 наблюдалась экспрессия других цитокинов [14, 48]. При действии Zn<sup>2+</sup>-связывающей металлопротеазы (PrtV) и цитолизина (VCC) холерных вибрионов на полностью дифференцированные клетки Т84 зафиксирована повышенная межклеточная проницаемость и продукция IL-8 и TNF- $\alpha$  [37].

Также было показано, что НА/Р кальций-зависимая и трипсин-подобная сериновая протеаза (VesC), секретирующиеся в составе везикул наружных мембран, транспортируются в эпителиальные клетки в активной форме по клатрин-опосредованному эндоцитозу и увеличивают уровень интерлейкина-8 (IL-8) в клетках Т84 [34].

Как описано выше, культура клеток Т84 используется для изучения механизма действия токсина, дополнительных токсинов и протеаз холерных вибрионов, представляет собой эффективную модель для оценки влияния токсинов на структурную организацию плотных контактов клеток кишечного эпителия.

### Заключение

В настоящее время культура клеток кишечного эпителия человека как модельная система признана

надежным инструментом для изучения молекулярных механизмов взаимодействия холерных вибрионов с клетками энтероцитов. На сегодняшний день она широко применяется для скрининговых целей при изучении адгезии холерных вибрионов, их влияния на плотные контакты клеток, транспорта электролитов, процессов всасывания, а также при оценке интернализации токсинов *in vitro*. Анализ литературы показывает, что замена традиционной модели лабораторных животных более технологичной клеточной моделью *in vitro* подтверждена экспериментальными работами как отечественных, так и зарубежных авторов. Использование разных линий культур клеток человеческого эпителия для изучения различных процессов в ответ на действие бактериальных патогенов, в том числе и возбудителя холеры с энтероцитами, увеличивает ценность и убедительность экспериментальных данных, если они воспроизводятся в независимых опытах, выполняемых на разных линиях.

### Литература

1. Алпеева Е.В., Сидоренкова А.Ф., Воротея Е.А. Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке петри до «органов-на-чипах» // Вестник Московского университета. Серия «Биология». — 2017. — Т. 72. — № 4. — С. 187–198.
2. Вечканов Е.М., Сорокина И.А. Клеточная инженерия. — Ростов н/Д: ЮФУ, 2012. — 134 с.
3. Кретенчук О.Ф., Коршенко В.А., Ципелева И.А. Модели клеточных линий и возможности их использования при изучении свойств холерных вибрионов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2021. — Т. 17. — № 3. — С. 69–79.
4. Мазеркина И.А., Евтеев В.А., Прокофьев А.Б., Муслимова О.В., Демченкова Е.Ю. Экспериментальные модели клеточных линий для скрининга нефротоксичности // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2021. — Т. 11. — № 3. — С. 160–166.
5. Монахова Е.В., Архангельская И.В., Писанов Р.В., Титова С.В. Особенности первичной структуры цитотоксина MARTX нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* разных серогрупп // Проблемы особо опасных инфекций. — 2018. — № 3. — С. 73–77.
6. Монахова Е.В., Демидова Г.В., Писанов Р.В., Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* с повышенной продукцией нейраминидазы *Vibrio cholerae* // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 2. — С. 87–92.
7. Монахова Е.В., Мазрухо А.Б. Токсины холерных вибрионов: пути реализации возбудителем патогенных свойств /

- Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. — Дониздат, 2012. — С. 101–108.
8. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути её реализации (Обзор) // Проблемы особо опасных инфекций. — 2013. — № 4. — С. 60–68.
  9. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В., Ежова М.И., Иванов С.А. Вариабельность генов *sef* токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 // Проблемы особо опасных инфекций. — 2017. — № 4. — С. 50–55.
  10. Мохов А.А., Мурашев А.Н., Красильщикова М.С., Хохлова О.Н., Семушина С.Г., Рассказова Е.А., Ржевский Д.И., Попов В.С., Яворский А.Н. О необходимости совершенствования законодательства в сфере использования лабораторных животных // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2016. — № 4. — С. 62–68.
  11. Саямов С.Р., Монахова Е.В., Федоренко Г.М., Ткачева Т.И., Маркина О.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В., Бардахчян Е.А. Изменения ультраструктуры в культивируемых клетках под действием гемагглютинин/протеазы холерного вибриона // Вестник экспериментальной биологии и медицины. — 2012. — Т. 152. — С. 456–460.
  12. Alamdary S.Z., Bakhshi B., Soudi S. The anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of *Lactobacillus acidophilus* on *Shigella sonnei* and *Vibrio cholerae* interaction with intestinal epithelial cells: A comparison between invasive and non-invasive bacteria // PLoS One. — 2018. — Vol. 13. — Issue 6. — e0196941. doi: 10.1371/journal.pone.0196941.
  13. Alamdary S.Z., Bakhshi B. *Lactobacillus acidophilus* attenuates toxin production by *Vibrio cholerae* and *Shigella dysenteriae* following intestinal epithelial cells infection // Microb Pathog. — 2020. — Vol. 149. — Art. 104543 doi: 10.1016/j.micpath.2020.104543.
  14. Bandyopadhyaya A., Sarkar M., Chaudhuri K. Transcriptional up regulation of inflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells following *Vibrio cholerae* infection // FEBS J. — 2007. — Vol. 274. — P. 4631–4642.
  15. Bhattaram V., Upadhyay A., Yin H.B., Mooyottu S., Venkitanarayanan K. Effect of dietary minerals on virulence attributes of *Vibrio cholera* // Front. Microbiol. — 2017. — Vol. 8. — Art. 911. doi: 10.3389/fmicb.2017.00911.
  16. Blanco L.P., Di Rita V.J. Bacterial-associated cholera toxin and GM1 binding are required for transcytosis of classical biotype *Vibrio cholerae* through an in vitro M cell model system // Cell. Microbiol. — 2006. — Vol. 8. — P. 982–998.
  17. Cencič A., Langerholc T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology — A review // International Journal of Food Microbiology. — 2010. — Vol. 141. — P. 4–14.
  18. Chakraborty K., Ghosh S., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Saha D.R., Mukhopadhyay D., Roychowdhury S., Hamabata T., Takeda Y., Das S. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells // Cell. Microbiol. — 2008. — Vol. 10. — P. 2520–2537.
  19. Charania Z., Vanmaele R., Armstrong G.D. A bioassay for cholera-like toxins using HT29 cells // Journal of Microbiological Methods. — 1991. — Vol. 14. — P. 171–176.
  20. Chatterjee D., Chaudhuri K. *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 protein-dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 cell responses // Biological chemist. — 2013. — Vol. 288. — No. 6. — P. 4299–4309.
  21. Flach C.F., Qadri F., Bhuiyan T.R., Alam N.H., Jennische E., Lonroth I., Holmgren J. Broad up-regulation of innate defense factors during acute cholera // Infect. Immun. — 2007. — Vol. 75. — P. 2343–2350.
  22. Fullner K.J., Lencer W.I., Mekalanos J.J. *Vibrio cholerae*-induced cellular responses of polarized T84 intestinal epithelial cells are dependent on production of cholera toxin and the RTX toxin // Infect. Immun. — 2001. — Vol. 69. — P. 6310–6317.
  23. Ghasemi M., Bakhshi B., Khashei R., Soudi S. Modulatory effect of *Vibrio cholerae* toxin co-regulated pilus on mucins, toll-like receptors and NOD genes expression in co-culture model of Caco-2 and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) // Microb Pathog. — 2020. — Vol. 149. — Art. 104566. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104566.
  24. Ghasemi M., Bakhshi B., Khashei R., Soudi S., Boustanshenas M. *Vibrio cholerae* toxin coregulated pilus provokes inflammatory responses in Coculture model of Caco-2 and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) leading to increased colonization // Microbio Immunol. — 2021. — Vol. 65. — No. 6. — P. 238–244.
  25. Goldblum S.E., Rai U., Tripathi A., Thakar M., De Leo L., Di Toro N., Not T., Ramachandran R., Puche A.C., Hollenberg M.D., Fasano A. The active Zot domain (aa 288–293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation // FASEB J. — 2011. — Vol. 25. — P. 144–158.
  26. Gutierrez M.G., Saka H.A., Chinen I., Zoppino F.C., Yoshimori T., Bocco J.L., Colombo M.I. Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2007. — Vol. 104. — P. 1829–1834.
  27. Harrison L.M., Rallabhandi P., Michalski J., Zhou X., Steyert S.R., Vogel S.N., Kaper J.B. *Vibrio cholerae* flagellins induce Toll-like receptor 5-mediated interleukin-8 production through mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB activation // Infect. Immun. — 2008. — Vol. 76. — P. 5524–5534.

28. Hartung T. Thoughts on limitations of animal models // *Parkinsonism Relat. Disord.* — 2008. — Vol. 14. — Suppl. 2. — S81–S83.
29. Hoffmann P., Burmester M., Langeheine M., Brehm R., Empl M.T., Seeger B., Breves G. Caco-2/HT29-MTX cocultured cells as a model for studying physiological properties and toxin-induced effects on intestinal cells // *PLoS One.* — 2021. — Vol. 16. — No. 10. — e0257824. doi: 10.1371/journal.pone.0257824.
30. Kerneis S., Caliot E., Stubbe H., Bogdanova A., Kraehenbuhl J., Pringault E. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: A technical update // *Microbes Infect.* — 2000. — Vol. 2. — P. 1119–1124.
31. Krebs S.J., Taylor R.K. Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model // *J. Bacteriol.* — 2011. — Vol. 193. — P. 5260–5270.
32. Lencer W.I., Reinhart F.D., Neutra M.R. Interaction of cholera toxin with cloned human goblet cells in monolayer culture // *Am. J. Physiol.* — 1990. — Vol. 258. — P. 96–102.
33. Moal V.L., Servina A.L. Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: Lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2013. — Vol. 77. — No. 3. — P. 380–439.
34. Mondal A., Tapader R., Sekhar N., Ghosh C.A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pala A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae* // *Infect Immun.* — 2016. — Vol. 84. — No. 5. — P. 1478–1490.
35. Ogura K., Yahiro K., Moss J. Cell death signaling pathway induced by Cholix toxin, a cytotoxin and eEF2 ADP-ribosyltransferase produced by *Vibrio cholerae* // *Toxins (Basel).* — 2021. — Vol. 13. — No. 1. — Art. 12. doi: 10.3390/toxins13010012.
36. Ogura K., Yahiro K., Tsutsuki H., Nagasawa S., Yamasaki S., Moss J., Noda M. Characterization of Cholix toxin-induced apoptosis in HeLa cells // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286. — P. 37207–37215.
37. Ou G., Rompikuntal P.K., Bitar A., Lindmark B., Vaitkevicius K., Wai S.N., Hammarstrom M.L. *Vibrio cholerae* cytolysin causes an inflammatory response in human intestinal epithelial cells that is modulated by the PrtV protease // *PLoS One.* — 2009. — Vol. 4. — No. 11. — e7806. doi: 10.1371/journal.pone.0007806.
38. Panigrahi P., Tall B.D., Russell R.G., Detolla L.J., Morris J.G. Development of an in vitro model for study of non-O1 *Vibrio cholerae* virulence using Caco-2 cells // *Infect. Immun.* — 1990. — Vol. 58. — P. 3415–3424.
39. Pearce S.C., Coia H.G., Karl J.P., Pantoja-Feliciano I.G., Zachos N.C., Racicot K. Intestinal in vitro and ex vivo models to study host-microbiome interactions and acute stressors // *Front Physiol.* — 2018. — Vol. 12. — No. 9. — Art. 1584. doi: 10.3389/fphys.2018.01584.
40. Pérez-Reytor D., Jaña V., Pavez L., Navarrete P., García K. Accessory toxins of vibrio pathogens and their role in epithelial disruption during infection // *Front. Microbiol.* — 2018. — Vol. 9. — Art. 2248. doi: 10.3389/fmicb.2018.02248.
41. Ryu B., Son M., Jung K.B., Kim U., Kim J., Kwon O., Son Y.S., Jung C., Park J., Kim C. Next-generation intestinal toxicity model of human embryonic stem cell-derived enterocyte-like cells // *Front. Vet. Sci.* — 2021. — Vol. 8. — Art. 587659. doi: 10.3389/fvets.2021.587659.
42. Sarwar S., Ali A., Pal M., Chakrabarti P. Zinc oxide nanoparticles provide anti-cholera activity by disrupting the interaction of cholera toxin with the human GM1 receptor // *Biol Chem.* — 2017. — Vol. 292. — No. 44. — P. 18303–18311.
43. Senoh M., Ghosh-Banerjee J., Mizuno T., Shinoda S., Miyoshi S., Hamabata T., Nair G.B., Takeda Y. Isolation of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 from environmental water samples in Kolkata, India, in a culturable state // *Microbiologyopen.* — 2014. — Vol. 3. — No. 2. — P. 239–246.
44. Senoh M., Hamabata T., Takeda Y. A factor converting viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to a culturable state in eukaryotic cells is a human catalase // *Microbiologyopen.* — 2015. — Vol. 4. — No. 4. — P. 589–596.
45. Sperandio V., Giron J.A., Silveira W.D., Kaper J.B. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae* // *Infect. Immun.* — 1995. — Vol. 63. — P. 4433–4438.
46. Xicohtencatl-Cortes J., Lyons S., Chaparro A.P., Hernandez D.R., Saldana Z., Ledesma M.A., Rendon M.A., Gewirtz A.T., Klose K.E., Giron J.A. Identification of proinflammatory flagellin proteins in supernatants of *Vibrio cholerae* O1 by proteomics analysis // *Mol. Cell. Proteomics.* — 2006. — Vol. 5. — P. 2374–2383.
47. Yang J.S., Jeon J.H., Jang M.S., Kang S.S., Ahn K.B., Song M., Yun C.H., Han S.H. *Vibrio cholerae* OmpU induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells // *Molecular Immunology.* — 2018. — Vol. 93. — P. 47–54.
48. Zhou X., Gao D.Q., Michalski J., Benitez J.A., Kaper J.B. Induction of interleukin-8 in T84 cells by *Vibrio cholerae* // *Infect. Immun.* — 2004. — Vol. 72. — P. 389–397.
49. Zingl F.G., Thapa H.B., Scharf M., Kohl P., Müller A.M., Schilda S. Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake // *mBio.* — 2021. — Vol. 12. — No. 3. — e0053421. doi: 10.1128/mBio.00534-21.

## References

- Alpeyeva Ye V., Sidorenkova AF, Vorotelya Ye A. Eksperimental'nyye kletochnyye sistemy: ot organov v

- chashke petri do «organov-na-chipakh». Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya «Biologiya» 2017; 72(4):187–198 (in Russian).
2. Vechkanov YeM, Sorokina IA. Kletochnaya inzheneriya. Rostov-na-Donu: YUFU, 2012: 134 (in Russian).
  3. Kretenchuk OF, Korshenko VA, Shchipeleva IA. Modeli kletochnykh liniy i vozmozhnosti ikh ispol'zovaniya pri izuchenii svoystv kholernykh vibriionov. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova 2021; 17(3):69–79 (in Russian).
  4. Mazerkina IA, Yevteyev VA, Prokof'yev AB, Muslimova OV, Demchenkova YeYu. Eksperimental'nyye modeli kletochnykh liniy dlya skringinga nefrotoksichnosti. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya 2021; 11(3):160–166 (in Russian).
  5. Monakhova YeV, Arkhangel'skaya IV, Pisanov RV, Titova SV. Osobennosti pervichnoy struktury tsitotoksina MARTX netoksigennykh shtammov *Vibrio cholerae* raznykh serogrupp. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2018(3):73–77 (in Russian).
  6. Monakhova YeV, Demidova GV, Pisanov RV, Duvanova OV, Mishan'kin BN. Rekombinantnyy shtamm *Escherichia coli* s povyshennoy produktsiyey neyraminidazy *Vibrio cholerae*. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2019(2):87–92 (in Russian).
  7. Monakhova YeV, Mazrukho AB. Toksiny kholernykh vibriionov: puti realizatsii vzbuditelem patogennykh svoystv. Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriiony: Materialy problemnoy komissii (48.04) Koordinatsionnogo nauchnogo soveta po sanitarno-epidemiologicheskoy okhrane territorii Rossiyskoy Federatsii. Donizdat, 2012:101–108 (in Russian).
  8. Monakhova YeV. Strategiya virulentnosti kholernykh vibriionov i puti yeyo realizatsii (Obzor). Problemy osobo opasnykh infektsiy 2013(4):60–68 (in Russian).
  9. Monakhova YeV, Pisanov RV, Titova SV, Yezhova MI, Ivanov SA. Variabel'nost' genov cef toksigennykh i netoksigennykh shtammov *Vibrio cholerae* O1. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2017(4):50–55 (in Russian).
  10. Mokhov AA, Murashev AN, Krasil'shchikova MS, Khokhlova ON, Semushina SG, Rasskazova YeA, Rzhhevskiy DI, Popov VS, Yavorskiy AN. O neobkhodimosti sovershenstvovaniya zakonodatel'stva v sfere ispol'zovaniya laboratornykh zhivotnykh. Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya 2016(4):62–68 (in Russian).
  11. Sayamov SR, Monakhova YeV, Fedorenko GM, Tkacheva TI, Markina OV, Alekseyeva LP, Pisanov RV, Bardakhchyan YeA. Izmeneniya ul'trastruktury v kul'tiviruyemykh kletkakh pod deystviyem gemagglutinin/proteazy kholernogo vibriiona. Vestnik eksperimental'noy biologii i meditsiny 2012; 152:456–460 (in Russian).
  12. Alamdary SZ, Bakhshi B, Soudi S. The anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of *Lactobacillus acidophilus* on *Shigella sonnei* and *Vibrio cholerae* interaction with intestinal epithelial cells: A comparison between invasive and non-invasive bacteria. PLoS One 2018; 13(6):e0196941. doi: 10.1371/journal.pone.0196941.
  13. Alamdary SZ, Bakhshi B. *Lactobacillus acidophilus* attenuates toxin production by *Vibrio cholerae* and *Shigella dysenteriae* following intestinal epithelial cells infection. Microb Pathog 2020; 149:104543 doi: 10.1016/j.micpath.2020.104543.
  14. Bandyopadhyaya A., Sarkar M., Chaudhuri K. Transcriptional up regulation of inflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells following *Vibrio cholerae* infection. FEBS J 2007; 274:4631–4642.
  15. Bhattaram V, Upadhyay A, Yin HB, Mooyottu S, Venkitanarayanan K. Effect of dietary minerals on virulence attributes of *Vibrio cholera*. Front. Microbiol 2017; 8:911. doi: 10.3389/fmicb.2017.00911.
  16. Blanco LP, Di Rita VJ. Bacterial-associated cholera toxin and GM1 binding are required for transcytosis of classical biotype *Vibrio cholerae* through an in vitro M cell model system. Cell Microbiol 2006; 8:982–998.
  17. Cencič A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology – A review. International Journal of Food Microbiology 2010; 141:4–14.
  18. Chakraborty K, Ghosh S, Koley H, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Saha DR, Mukhopadhyay D, Roychowdhury S, Hamabata T, Takeda Y, Das S. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. Cell Microbiol 2008; 10:2520–2537.
  19. Charania Z, Vanmaele R, Armstrong GD. A bioassay for cholera-like toxins using HT29 cells. Journal of Microbiological Methods 1991; 14:171–176.
  20. Chatterjee D, Chaudhuri K. *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 protein-dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 cell responses. Biological chemist 2013; 288(6):4299–4309.
  21. Flach CF, Qadri F, Bhuiyan TR, Alam NH, Jennische E, Lonnoth I, Holmgren J. Broad up-regulation of innate defense factors during acute cholera. Infect Immun 2007; 75:2343–2350.
  22. Fullner KJ, Lencer WI, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae*-induced cellular responses of polarized T84 intestinal epithelial cells are dependent on production of cholera toxin and the RTX toxin. Infect Immun 2001; 69:6310–6317.
  23. Ghasemi M, Bakhshi B, Khashei R, Soudi S. Modulatory effect of *Vibrio cholerae* toxin co-regulated pilus on mucins, toll-like receptors and NOD genes expression in co-culture model of Caco-2 and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Microb Pathog 2020; 149:104566. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104566.
  24. Ghasemi M, Bakhshi B, Khashei R, Soudi S, Boustanshenas M. *Vibrio cholerae* toxin coregulated pilus provokes inflamma-

- tory responses in Coculture model of Caco-2 and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) leading to increased colonization. *Microbio Immunol* 2021; 65(6):238–244.
25. Goldblum SE, Rai U, Tripathi A, Thakar M, De Leo L, Di Toro N, Not T, Ramachandran R, Puche AC, Hollenberg MD, Fasano A. The active Zot domain (aa 288–293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation. *FASEB J* 2011; 25:144–158.
  26. Gutierrez MG, Saka HA, Chinen I, Zoppino FC, Yoshimori T, Bocco JL, Colombo MI. Protective role of autophagy against *Vibrio cholerae* cytolysin, a pore-forming toxin from *V. cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:1829–1834.
  27. Harrison LM, Rallabhandi P, Michalski J, Zhou X, Steyert SR, Vogel SN, Kaper JB. *Vibrio cholerae* flagellins induce Toll-like receptor 5-mediated interleukin-8 production through mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB activation. *Infect Immun* 2008; 76:5524–5534.
  28. Hartung T. Thoughts on limitations of animal models. *Parkinsonism Relat. Disord* 2008; 14(2):S81–S83.
  29. Hoffmann P, Burmester M, Langeheine M, Brehm R, Empl MT, Seeger B, Breves G. Caco-2/HT29-MTX co-cultured cells as a model for studying physiological properties and toxin-induced effects on intestinal cells. *PLoS One* 2021; 16(10):e0257824. doi: 10.1371/journal.pone.0257824.
  30. Kerneis S, Caliot E, Stubbe H, Bogdanova A, Kraehenbuhl J, Pringault E. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: A technical update. *Microbes Infect* 2000; 2:1119–1124.
  31. Krebs SJ, Taylor RK. Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. *J Bacteriol* 2011; 193:5260–5270.
  32. Lencer WI, Reinhart FD, Neutra MR. Interaction of cholera toxin with cloned human goblet cells in monolayer culture. *Am J Physiol* 1990; 258:96–102.
  33. Moal VL, Servina AL. Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: Lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013; 77(3):380–439.
  34. Mondal A, Tapader R, Sekhar N, Ghosh CA, Sinha R, Koley H, Saha DR, Chakrabarti MK, Wai SN, Pala A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 2016; 84(5):1478–1490.
  35. Ogura K, Yahiro K, Moss J. Cell death signaling pathway induced by Cholix toxin, a cytotoxin and eEF2 ADP-ribosyltransferase produced by *Vibrio cholerae*. *Toxins (Basel)* 2021; 13(1):12. doi: 10.3390/toxins13010012.
  36. Ogura K, Yahiro K, Tsutsuki H, Nagasawa S, Yamasaki S, Moss J, Noda M. Characterization of Cholix toxin-induced apoptosis in HeLa cells. *J Biol Chem* 2011; 286:37207–37215.
  37. Ou G, Rompikuntal PK, Bitar A, Lindmark B, Vaitkevicius K, Wai SN, Hammarstrom ML. *Vibrio cholerae* cytolysin causes an inflammatory response in human intestinal epithelial cells that is modulated by the PrtV protease. *PLoS One* 2009; 4(11):e7806. doi: 10.1371/journal.pone.0007806.
  38. Panigrahi P, Tall BD, Russell RG, Detolla LJ, Morris JG. Development of an in vitro model for study of non-O1 *Vibrio cholerae* virulence using Caco-2 cells. *Infect Immun* 1990; 58:3415–3424.
  39. Pearce SC, Coia HG, Karl JP, Pantoja-Feliciano IG, Zachos NC, Racicot K. Intestinal in vitro and ex vivo models to study host-microbiome interactions and acute stressors. *Front Physiol* 2018; 12(9):1584. doi: 10.3389/fphys.2018.01584.
  40. Pérez-Reytor D, Jaña V, Pavez L, Navarrete P, García K. Accessory toxins of vibrio pathogens and their role in epithelial disruption during infection. *Front Microbiol* 2018; 9:2248. doi: 10.3389/fmicb.2018.02248.
  41. Ryu B, Son M, Jung KB, Kim U, Kim J, Kwon O, Son YS, Jung C, Park J, Kim C. Next-generation intestinal toxicity model of human embryonic stem cell-derived enterocyte-like cells. *Front Vet Sci* 2021; 8:587659. doi: 10.3389/fvets.2021.587659.
  42. Sarwar S, Ali A, Pal M, Chakrabarti P. Zinc oxide nanoparticles provide anti-cholera activity by disrupting the interaction of cholera toxin with the human GM1 receptor. *Biol Chem* 2017; 292(44):18303–18311.
  43. Senoh M, Ghosh-Banerjee J, Mizuno T, Shinoda S, Miyoshi S, Hamabata T, Nair GB, Takeda Y. Isolation of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 from environmental water samples in Kolkata, India, in a culturable state. *Microbiologyopen* 2014; 3(2):239–246.
  44. Senoh M, Hamabata T, Takeda Y. A factor converting viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to a culturable state in eukaryotic cells is a human catalase. *Microbiologyopen* 2015; – Vol.4(4):589–596.
  45. Sperandio V, Giron JA, Silveira WD, Kaper JB. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1995; 63:4433–4438.
  46. Xicohtencatl-Cortes J, Lyons S, Chaparro AP, Hernandez DR, Saldana Z, Ledesma MA, Rendon MA, Gewirtz AT, Klose KE, Giron JA. Identification of proinflammatory flagellin proteins in supernatants of *Vibrio cholerae* O1 by proteomics analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 2006; 5:2374–2383.
  47. Yang JS, Jeon JH, Jang MS, Kang SS, Ahn KB, Song M, Yun CH, Han SH. *Vibrio cholerae* OmpU induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *Molecular Immunology* 2018; 93:47–54.
  48. Zhou X, Gao DQ, Michalski J, Benitez JA, Kaper JB. Induction of interleukin-8 in T84 cells by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 2004; 72:389–397.
  49. Zingl FG, Thapa HB, Scharf M, Kohl P, Müller AM, Schilda S. Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake. *mBio* 2021; 12(3):e0053421. doi: 10.1128/mBio.00534-21.

## APPLICATION OF HUMAN INTESTINAL CELL LINES IN THE STUDY OF *VIBRIO CHOLERAE*

O.A. YAKUSHEVA, L.P. ALEKSEEVA, V.V. EVDOKIMOVA, V.P. ZYUZINA, D.I. SIMAKOVA

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

This review presents data on human intestinal cell lines, which are used as an alternative to biomodels to obtain new information on cholera vibriones. The lines and their clones most commonly used to study the molecular mechanisms of interaction of cholera vibriones with enterocyte cells are considered.

*Keywords:* cell lines, *Vibrio cholerae*, adhesion, cholera toxin, additional toxins, cytotoxicity.

### **Address:**

Yakusheva O.A.

Research associate of laboratory of diagnostic preparations

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

Rostov-on-Don

E-mail: yakusheva\_oa@antiplague.ru

### **Для цитирования:**

Якушева О.А., Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Зюзина В.П., Симакова Д.И. Применение линий клеток кишечника человека в исследовании *Vibrio cholerae*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):91–102.

### **For citation:**

Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Evdokimova V.V., Zyuzina V.P., Simakova D.I. Application of human intestinal cell lines in the study of vibrio cholerae. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):91–102 (in Russian).

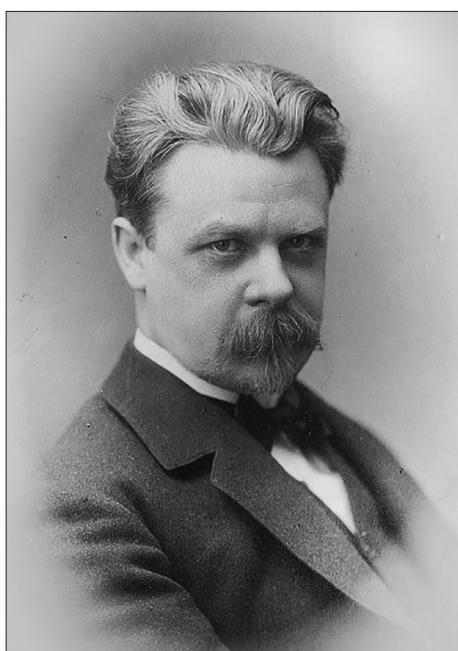
## К 150-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ Н.К. КОЛЬЦОВА (1872–1940)

В.С. ВОРОБЬЕВ\*

*Психологический институт РАО, Москва*

В связи со 150-летием со дня рождения видного отечественного биолога Н.К. Кольцова представлена мемориальная статья. Ранее в 2010 году в журнале была подробная публикация о нем. Поэтому многие биографические факты опущены, а акцент сделан на издательскую активность, научно-популярные интересы, личностные черты, отдельные высказывания и др.

*Ключевые слова:* история биологии, Н.К. Кольцов, 150-летие со дня рождения.



Юбилейная дата 150-летия со дня рождения имеет особое, рубежное значение. Она может быть соизмеримой с историческим периодом реального прогресса определенной научной отрасли. Вполне возможно отнести это и к биологии, которая за полтора столетия достигла столь впечатляющих успехов. Не будет преувеличением мнение о том, что в суммарном итоге ключевых событий в накоплении преемственных биологических знаний есть ниша, отведенная интеллектуальному вкладу выдающегося отечественного биолога Николая Константиновича Кольцова.

© 2022 г. Воробьев В.С.

\* **Автор для переписки:**

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., научный сотрудник ПИ РАО

E-mail: vorob\_vs@mail.ru

Его провидческие мысли о «наследственной молекуле», оформившиеся 100 лет назад и представленные научному сообществу в виде докладов, статей, книг в конце 1920-х — начале 1930-х годов [4, 6, 7, 20], безусловно, относятся к беспрецедентным достижениям человеческого разума. Этот факт достаточно утвердился в русскоязычной литературе начиная с того времени и отчасти был признан наиболее объективными, знающими специалистами за рубежом 1930-х годов (например, видным английским биологом Дж. Холдейном). Не наша вина, а скорее беда заключается в том, что последующий разгром генетики в нашей стране фактически на 30 лет вычеркнул имя Н.К. Кольцова и других крупных российских ученых из информационного поля биологии. Сейчас эта аномалия ликвидирована, и все стало на свои места. Восстановлена историческая справедливость, переизданы классические труды, проведен объективный ретроспективный и текущий анализ жизни и деятельности ученого. Вышли биографические книги (Полынин В.М., 1969 [10]; Астауров Б.Л., Рокицкий П.Ф., 1975 [1]; Раменский Е.В., 2012 [13, 15]). Появился ряд публикаций (Сойфер В.Н., 2002) [16]. Автор настоящей статьи также писал о деятельности Н.К. Кольцова [3]. Имеется соответствующая информация в интернете. В 2021 году был снят телефильм «Николай Кольцов. Загадка жизни». <https://www.youtube.com/watch?v=Slrz-OrTl6Y> [19]. Откликнулись на юбилей Российская академия наук (<http://www.ras.ru/news/shownews.aspx?id=6bcd96f3-3c62-436b-a41c-99277bf5f044>) [18], Государственный дарвиновский музей и профильные институты (Институт биологии развития РАН им. Н.К. Кольцова и др.). Вышла хорошо документированная книга к 150-летию со дня рождения ученого [8]. Имеется также несколько исследований, где затрагивается тема деятельности Н.К. Кольцова [2, 12, 14, 17].

Конечно, приходится только сожалеть о том, что Кольцов ушел из жизни в расцвете сил и не до конца осуществил все задуманное им. Указанная дата дает возможность еще раз вспомнить о личности и делах замечательного представителя нашей науки. Биографические факты, скорее всего, придется опустить, чтобы не повторяться, а акцент сделать на другие моменты, например, на его научно-популярные интересы, издательскую активность, черты личности, высказывания: его собственные и о нем и др.

Прежде всего, следует вспомнить о главном вкладе ученого. Есть крайне ценный отзыв Прокофьевой-Бельговской А.А., которая нашла подбоающие слова о его первопроходческих взглядах [11]. Чем ценна ее характеристика, представляющую собой ближнюю ретроспекцию. Ведь она была живым свидетелем появления центральной идеи Кольцова о самоудвоении наследственной молекулы. Сейчас слишком много написано об этом, и можно потеряться в фактах и домысливать задним числом. Вот ее подлинные слова о Кольцове. «Еще в 1927 г. Кольцов высказал гипотезу, что основная скелетная нить хромосомы — генома — есть не что иное, как огромная белковая молекула или пучок длинных одинаковых молекул (мицелл), а радикалы этой молекулы — локусы генов. Вначале эта гипотеза была встречена весьма сдержанно, она казалась парадоксальной. Дело в том, что химикам того времени не были известны молекулы столь гигантских размеров. Еще более парадоксальным казалось предположение Кольцова о том, что сложные молекулы белковых соединений не могут создаваться в организме заново: всякая сложная органическая молекула возникает из окружающего раствора только при наличии уже готовой, служащей затравкой, молекулы-матрицы. По предположению Кольцова процесс репродукции хромосомы осуществляется по такому же принципу: автокаталитическое построение около исходной белковой геномы точно соответствующей ей копии. Гипотеза молекулярного строения и репродукции хромосомы была опубликована Н.К. Кольцовым в 1928 г. ... Н.К. Кольцов ошибался, рассматривая в качестве основы молекулярной организации хромосомы длинную полипептидную молекулу. Сведения о нуклеиновых кислотах в тот период были крайне ограничены. Но сам принцип решения Кольцовым проблемы организации и репродукции хромосомы был правилен, и можно только удивляться широте научной эрудиции и интуиции этого замечательного ученого, который прозорливо, за 30 лет до возникновения молекулярной биологии, предугадал истинное решение одной из кардинальных проблем генетики». Трудно сказать лучше этого.

Несмотря на все перипетии научной дискуссии и обстоятельств жизни, Кольцову удалось создать школу экспериментальной биологии. Это были десятки преданных науке специалистов [9]. Среди них такие известные ученые, как Н.В. Тимофеев-Ресовский, С.С. Четвериков, Б.Л. Астауров, В.В. Сахаров, И.А. Рапопорт, Н.П. Дубинин, В.П. Эфроимсон и многие другие. Многогранны были направления их работ: генетика растений и животных, популяционная генетика, радиационный и химический мутагенез, полиплоидия, сложная структура гена, регуляция пола животных, в том числе с целью решения народнохозяйственных задач, гидробиология. Сам лично Н.К. Кольцов в 1935 году предложил схему многонитчатого строения гигантских политенных хромосом в ядрах клеток слюнных желез двукрылых. Безусловно, его цикл работ по цитоскелету также основателен и общепризнан [21]. Все это разнообразие было объединено одной интегральной идеей — принципами организации клетки. Не зря одна из его фундаментальных книг была названа «Организация клетки» [5]. В списке литературы приводятся уже упомянутые труды Кольцова [4, 6, 7, 20] и ссылки на исследования о нем [14].

Кольцов был человеком с огромной полимодальностью интересов: кроме общих вопросов биологии и генетики — цитология, биохимия, механика развития и т.д. Содержательный, начитанный, сосредоточенный на постоянном погружении в раздумья, он производил благоприятное впечатление. Особенно это запечатлелось в памяти зарубежных специалистов, с которыми он часто контактировал во время стажировок на биостанциях Европы. Среди них был будущий цвет биологической науки. В этом отношении показательна характеристика одного из них — Рихарда Гольдшмидта: «Там был блестящий Николай Кольцов, возможно, лучший зоолог нашего поколения, доброжелательный, немисливо образованный, ясно мыслящий ученый, обожаемый всеми, кто его знал».

Есть и исторические оценки творчества авторитетными современными учеными. Например, слова академика В.А. Энгельгардта: «Не будет преувеличением сказать, что огромная заслуга всего развития физико-химической биологии в Советском Союзе, в первые решающие периоды его становления, целиком должна быть отнесена за счет необычайно плодотворной деятельности выдающегося исследователя, организатора и пропагандиста науки — Николая Константиновича Кольцова».

Он щедро раздавал темы начинающим сотрудникам, нисколько не заботясь о своем авторстве. Этим объясняется секрет плодотворности его многочисленной школы. Есть за-



мечательные рассуждения Гельмгольца на данный счет — о нераздельности корпоративного творчества подвижников науки, особенно работающих в одном учреждении. Истинный ученый любит не себя в науке, а саму науку. В этом весь секрет выдающихся ученых прошлого. Сейчас — наоборот: молодые авторы пишут многочисленные дублирующие по содержанию статьи и слишком дорожат своим именем. Есть интересное наблюдение. Некоторые наиболее альтруистичные, благородные и благодарные ученики Кольцова потом сетовали, что не включали его в соавторы своих публикаций (работы с тутовым шелкопрядом, по полиплоидии и т.д.), особенно когда убеждались в немногочисленности этих материальных следов деятельности его, безвременно ушедшего из жизни по разным обстоятельствам. Находились и такие люди, которые ставили ему в упрек малое количество публикаций. Еще повторюсь о цепи тяжелых эмоциональных воздействий, выпавших на его долю. Одного только пребывания в камере смертников в почти 50-летнем возрасте с саморепортажами о переживаемых чувствах было более чем достаточно для укорочения его естественного земного пребывания.

Остается только добавить в дополнение к образу Н.К. Кольцова любовь к А.С. Пушкину и другим классикам русской литературы. Он многое из него знал

наизусть и любил декламировать. Еще в ученические годы самостоятельно издавал журнал с собственными сочинениями. Эти черты — духовная одаренность и потребность в самовыражении — еще полнее очерчивают уникальность и масштаб личности ученого. Художественный вкус у него был заметно выражен: он был искусным рисовальщиком, закончил все стандартные образовательные учреждения дореволюционной России с отличием (в том числе славившуюся московскую гимназию № 6 с золотой медалью). Он вообще был необыкновенным человеком: до трех лет не говорил, потом заговорил стихами. В четыре года освоил грамотность. Вряд ли нужно упоминать о владении иностранными языками. Он считал знание иностранного языка пропуском к началу занятий наукой и обязательно при собеседовании со студентами интересовался на этот счет. Все перечисленные обстоятельства свидетельствуют о том, что, по-видимому, природа умеет отбирать лучших представителей человечества.

Ученого отличала стойкая привычка к экспериментированию, причем, он отдавал предпочтение личным занятиям. В молодые годы он много работал в зарубежных лабораториях. В солидном возрасте он трудился в своем московском институте.



Кольцов за экспериментальной работой.

Безусловно, нельзя замалчивать те незаслуженные упреки, которые были сделаны в его адрес недобросовестными критиками. Он тяжело переживал это, но находил в себе силы вести аргументированную дискуссию. Это сказывалось на состоянии здоровья. В последний год жизни много сил отняли вызовы в следственные органы

по делу Н.И. Вавилова. Нужно особо подчеркнуть, что такая историческая несправедливость всегда вычеркивала из жизни и тот потенциал великих людей, который бы принес столько позитива, если бы они не ушли раньше обычного из жизни. Сейчас предпринимаются попытки ретроспективно восстановить развитие той или иной

идеи при гипотетическом альтернативном продлении естественной жизни и деятельности ее генератора, но здесь вступает в силу действие сослагательного наклонения, которое, как известно, неприменимо к науке да и к жизни вообще.

Одно здесь ясно и однозначно. Пагубность прецедентов Н.К. Кольцова сделала свое черное дело: он не успел реализовать многое из уже свершенных делов и задуманного им. Специалисты говорят об этом в отношении эпигенетики, регуляции пола, мутагенеза и других направлений, намеченных на перспективу [13]. Можно рассуждать, предполагать. Но действительность оказалась слишком суровой.

Есть у меня чисто эмоциональные воспоминания. Я любил всегда посещать библиотеки. Иногда бывал и в библиотеке Института биологии развития РАН (когда он еще не носил имя Кольцова). Здесь можно было в открытом доступе прикоснуться к книгам из личной библиотеки ученого, которые сохранились и нашли бережный приют в подходящем месте. Я чувствовал при этом влияние академика Б.Л. Астаурова, который по праву и долгу ученика сделал так много для восстановления доброго имени учителя (но что-то не успел). Конечно, я был в 1970-х годах на могиле Кольцова на Лефортовском (Немецком или Введенском) кладбище. Удивлялся по незнанию дате смерти мужа и жены в один день — 2 декабря 1940 года (потом узнал и о ее самоубийстве вслед за его смертью). Хорошо также, что ниточка благородных дел, связанных с памятью о Кольцове, не прерывается, и недавние мероприятия к его 150-летию это показали.

Вместе с именем Н.К. Кольцова почти всегда встает и трагическая судьба Н.И. Вавилова. Мне довелось лет 25 довольно близко общаться (скажу точнее — дружить) с его сыном, физиком Юрием Николаевичем Вавиловым. Он много мне рассказал о редких вещах. Я, кажется, в 1992 году был в Саратове и видел на местном кладбище безвестную символическую могилу Николая Ивановича Вавилова с памятным бюстом, умершего в здешней тюрьме от истощения. Та же, что и с Кольцовым, история. Душе каждого мыслящего человека тяжело воспринимать материальные следы вопиющей несправедливости по отношению к столь выдающимся сынам Отечества. Да, Кольцов и Вавилов — это незаживающие, кровоточащие раны на сердце отечественной биологии.

Но вернемся к основной линии повествования.

У Н.К. Кольцова есть много мудрых мыслей и точных высказываний:

«Есть люди, которые всю свою жизнь кладут на то, чтобы разобраться во лжи и правде, ищут истину о

жизни. Люди эти — ученые. Настоящий ученый должен всю свою жизнь отдать исканию истины — науке. Для него наука и истина больше и важнее, чем богатство, спокойная жизнь, почет и удовольствия. Были ученые, которые жили в неизвестности, умирали почти в нищете и оставляли вместо себя только написанные ими книги, но, когда люди научились понимать эти книги, они убеждались, как много сделали эти безвестные при жизни ученые, и ставили им памятники. Такова была судьба французского ученого Ламарка...».

«Обязанность» ученых — очищать мировоззрение современников от заблуждений».

«...Довольно широко распространено убеждение, что наука противопоставляется жизни. Жизнь с ее повседневными заботами и интересами течет сама собой, а наука, отрывающая человеческий ум от этих мелких запросов текущего дня, стоит где-то над жизнью, вне ее. Мысль ученого занята какими-то сложными, выпренимыми задачами, недоступными для понимания каждого обыкновенного человека, а в житейских вопросах он совсем беспомощен, теряется. Народный юмор подхватил эту оторванность ученого от жизни и зло, а иногда и довольно метко подчеркнул ее в художественных образах... Говорят, науки бывают разные: науки практические, или прикладные, нужные для практической жизни, и науки отвлеченные, без которых можно обойтись. Никто не станет смеяться над инженером, строящим завод. Но почему не посмеяться над астрономом, считающим звезды, или рассеянным математиком, вечно вычисляющим что-то непонятное, или над биологом, рассматривающим в микроскоп какие-то клеточки или козявки?» (из радиовыступления).

По поводу его травли и всеобщей антигенетической кампании у него есть взвешенные критические замечания, проникнутые болью за коллективные заблуждения большой массы людей:

«Надо исправить допущенные ошибки. Ведь от получившегося в результате сессии разгрома генетики пострадает, может быть, не один выпуск агрономов... С нас прежде всего спросит история, почему мы не протестовали против недостойного для Советского Союза нападения на науку... Невежество в ближайших выпусках агрономов обойдется стране в миллионы тонн хлеба. А ведь мы не меньше партийных большевиков любим нашу страну и гордимся успехами соцстроительства. Поэтому-то я не хочу и не могу молчать».

«Заменить генетику дарвинизмом нельзя, как нельзя дифференциальное исчисление заменить алгеброй (конечно, и обратно). Полвека в науке — большой пери-

од, и нельзя Советскому Союзу хотя бы в одной области отстать на 50 лет ...»

Еще цитата: «Я не отрекаюсь от того, что говорил и писал, и не отрекусь, и никакими угрозами вы меня не запугаете. Вы можете лишить меня звания академика, но я не боюсь, я не из робких».

Восхищает и не перестает удивлять издательская и вообще просветительская деятельность Кольцова. Здесь его пример беспрецедентен.

С 1912 по 1930 гг. он был главным редактором естественно-научного журнала «Природа» (журнал выходит до сих пор).



Обложка журнала, редактированного Н.К. Кольцовым

С 1922 года он выпускал «Успехи экспериментальной биологии», с 1925 г. переименованный в «Журнал экспериментальной биологии. Серия А и Б», а с 1932 г. преобразованный в «Биологический журнал». Премником этих изданий стал «Журнал общей биологии», издававшийся АН СССР и существующий по настоящее время.

В течение 10 лет в 1920-е годы он выпускал «Русский евгенический журнал», а потом сам же закрыл его, осознав бесперспективность данного направления.

Под редакцией Кольцова в 1920-е годы вышел ряд переводных изданий. Сам он написал несколько научно-популярных брошюр, например, «Причины современного исхудания» (1922). Все это свидетельствует о его энциклопедизме и широте взглядов.

Н.К. Кольцовым была основана в качестве приложения к журналу «Природа» серия «Классики естествознания». В ней вышли книги: И.И. Мечников «Лекции о сравнительной патологии воспаления», Г. Мендель «Опыты над растительными гибридами», труды У. Гарвея, К. Бэра. Он был руководителем биологического раздела серий «Современные проблемы естествознания» и «Классики науки». Здесь вышли книги Т. Моргана «Структурные основы наследственности», Р. Гольдшмидта «Механизм и физиология определения пола» и др.

Кольцов принимал участие в выпуске журналов и альманахов «Русское слово», «Наши достижения» и др. Он являлся соредктором биологического отдела 1-го издания БСЭ, редактором биологического отдела 1-го

издания БМЭ. Нередко печатал статьи в центральных газетах.

До 1930-го года он преподавал в МГУ, после чего его кафедру экспериментальной биологии закрыли. Правда, его ученики сумели сохранить кольцовские научные направления в московском университете. Хорошо понимая, что биологией надо заниматься не только по книгам, он способствовал созданию биостанций: Центральной (Аниковской), Звенигородской и в других местах.

В 1930-е годы он принимал участие во всех ключевых дискуссиях о генетике и селекции. Николай Константинович вел себя непримиримо по отношению к лысенковцам, выступившим с нападками на генетику. Больше того, он обращался во многие инстанции с письмами, разъясняющими ошибочность, а то и нелепость некоторых тенденций в науке и практике тех лет. Понимая, к чему клонят организаторы отдельных псевдодискуссий или общественных кампаний по дискредитации настоящих ученых, он указывал на недопустимое положение с преподаванием генетики в вузах, предугадав, к какому понижению уровня знаний в СССР это приведет.

Его бескомпромиссная позиция по отношению к невежеству или сознательному игнорированию подлинной науки послужила хорошим примером для следующих поколений исследователей, которым пришлось устранять последствия того театра абсурда, процветания «антинауки» и «антиобразования», которые существовали определенное время в истории нашего государства. В итоге вся деятельность Н.К. Кольцова в целом достаточно отражена в литературе по истории биологии, изданы его классические труды, многое о нем представлено в Интернете.

## Литература

1. Астауров Б.Л., Рокицкий П.Ф. Николай Константинович Кольцов / АН СССР. — М.: Наука, 1975. — 168 с.
2. Бабков В.В. Заря генетики человека. Русское евгеническое движение и начало медицинской генетики. — М.: Прогресс — Традиция, 2008. — 816 с.
3. Воробьев В.С. К 70-летию со дня смерти Николая Константиновича Кольцова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 10. — С. 55–67.
4. Кольцов Н.К. Избранные труды / Сост Т.Л. Маршак, Н.Д. Озернюк. — М.: Наука, 2006. — 294 с. — Памятники отечественной науки. XX век. <https://search.rsl.ru/ru/record/01002993703>.

5. Кольцов Н.К. Организация клетки: Сб. экспериментальных исследований, статей и речей 1903–1935 гг. — М.-Л., Биомедгиз, 1936. — 652 с.
6. Кольцов Н.К.: 1872–1940. — М.: Наука, 1976. — 78 с. — (Материалы к биобиблиографии ученых СССР).
7. Кольцов Н.К. Физико-химические основы морфологии хромосом // Успехи экспериментальной биологии. — 1928. — Т. 7. — № 1. — С. 3–31.
8. Николай Константинович Кольцов: очерки, статьи, письма, документы / Российская академия наук, отделение биологических наук, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Архив Российской академии наук; отв. редактор И.С. Захаров; составитель Е.Б. Астаурова. — М.: Научный мир, 2021. — 598 с.
9. Озернюк Н.Д. Научная школа Н.К. Кольцова. Ученики и соратники. — М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2012. — 360 с.
10. Польшин В.М. Пророк в своем Отечестве. — М.: Советская Россия, 1969. — 126 с.
11. Прокофьева-Бельговская А.А. Портрет на фоне хромосом. — М.: Научный мир, 2005. — 320 с.
12. Пчелов Е.В. Евгеника и генеалогия в отечественной науке 20-х годов // Гербовед. — 2006. — № 2. — С. 76–146.
13. Раменский Е.В. Николай Кольцов. Биолог, обогнавший время. — М.: Наука, 2012. — 385 с. — (Научно-популярная литература). [http://lit.lib.ru/r/ramenskij\\_n\\_w/text\\_0010.shtml](http://lit.lib.ru/r/ramenskij_n_w/text_0010.shtml).
14. Раменский Е.А. Николай Кольцов — биолог из будущего // Независимая газета, 2016. [https://www.ng.ru/nauka/2016-01-27/15\\_koltsov.html](https://www.ng.ru/nauka/2016-01-27/15_koltsov.html).
15. Раменский Е.В. Николай Константинович Кольцов, 1872–1940 / Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. — М.: Наука, 2007. — 30 л. — (Научно-биографическая литература).
16. Сойфер В.Н. Мужество великого Кольцова // Наука и жизнь. — 2002. — № 8. — С. 32–44.
17. Шноль С.Э. Герои и злодеи российской науки. — М.: Крон-Пресс, 1997.
18. <http://www.ras.ru/news/shownews.aspx?id=6bcd96f3-3c62-436b-a41c-99277bf5f044>.
19. <https://www.youtube.com/watch?v=Slrz-OrTl6Y>.
20. Koltzoff N.K. Physikalisch-chemische Grundlage der Morphologie // Biol. Zbl. — 1928. — Bd. 48. — H. 6. — S. 345–369.
21. Koltzoff N.K. Studien ueber die Gestalt der Zelle. II. Untersuchungen ueber das Kopfskelett des tierieschen Spermiums // Arch. Zellforsch. — 1908. — Bd. 2. — S. 1–65.

## References

1. Astaurov BL, Rokitskiy PF. Nikolay Konstantinovich Kol'tsov. AN SSSR. Moscow: Nauka, 1975: 168 (in Russian).

2. Babkov VV. Zarya genetiki cheloveka. Russkoye yevgenicheskoye dvizheniye i nachalo meditsinskoy genetiki. Moscow: Progress – Traditsiya, 2008: 816 (in Russian).
3. Vorob'yev VS. K 70-letiyu so dnya smerti Nikolaya Konstantinovicha Kol'tsova. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. YuA Ovchinnikova 2010; 6(10):55–67 (in Russian).
4. Kol'tsov NK. Izbrannyye trudy. Sost TL Marshak, ND Ozernyuk. Moscow: Nauka, 2006: 294. Pamyatniki otechestvennoy nauki. XX vek. <https://search.rsl.ru/ru/record/01002993703> (in Russian).
5. Kol'tsov NK. Organizatsiya kletki: Sb eksperimental'nykh issledovaniy, statey i rechey 1903–1935 gg. Moscow-Leningrad, Biomedgiz, 1936: 652 (in Russian).
6. Kol'tsov NK: 1872–1940. Moscow: Nauka, 1976: 78. (Materialy k biobibliografii uchenykh SSSR) (in Russian).
7. Kol'tsov NK. Fiziko-khimicheskiye osnovy morfologii khromosom. Uspekhi eksperimental'noy biologii 1928; 7(1):3–31 (in Russian).
8. Nikolay Konstantinovich Kol'tsov: ocherki, stat'i, pis'ma, dokumenty. Rossiyskaya akademiya nauk, otdeleniye biologicheskikh nauk, Institut biologii razvitiya im NK Kol'tsova, Arkhiv Rossiyskoy akademii nauk; otv redaktor IS Zakharov; sostavitel' YeB Astaurova. Moscow: Nauchnyy mir, 2021: 598 (in Russian).
9. Ozernyuk ND. Nauchnaya shkola NK Kol'tsova. Ucheniki i soratniki. Moscow: Tov-vo nauch. izd. KMK, 2012: 360 (in Russian).
10. Polynin VM. Prorok v svoem Otechestve. Moscow: Sovetskaya Rossiya, 1969: 126 (in Russian).
11. Prokof'yeva-Bel'govskaya AA. Portret na fone khromosom. Moscow: Nauchnyy mir, 2005: 320 (in Russian).
12. Pchelov YeV. Yevgenika i genealogiya v otechestvennoy nauke 20-kh godov. Gerboved 2006; 2:76–146 (in Russian).
13. Ramenskiy YeV. Nikolay Kol'tsov. Biolog, obognavshiy vremya. Moscow: Nauka, 2012: 385 (Nauchno-populyarnaya literatura). [http://lit.lib.ru/r/ramenskiy\\_n\\_w/text\\_0010.shtml](http://lit.lib.ru/r/ramenskiy_n_w/text_0010.shtml) (in Russian).
14. Ramenskiy YeA. Nikolay Kol'tsov – biolog iz budushchego. Nezavisimaya gazeta, 2016. [https://www.ng.ru/nauka/2016-01-27/15\\_koltsov.html](https://www.ng.ru/nauka/2016-01-27/15_koltsov.html) (in Russian).
15. Ramenskiy YeV. Nikolay Konstantinovich Kol'tsov, 1872–1940. In-t fiziologii rasteniy im KA Timiryazeva RAN. Moscow: Nauka, 2007: 30 (Nauchno-biograficheskaya literatura) (in Russian).
16. Soyfer VN. Muzhestvo velikogo Kol'tsova. Nauka i zhizn' 2002; 8:32–44 (in Russian).
17. Shnol' SE. Geroi i zlodei rossiyskoy nauki. Moscow: Kron-Press, 1997 (in Russian).
18. <http://www.ras.ru/news/shownews.aspx?id=6bcd96f3-3c62-436b-a41c-99277bf5f044> (in Russian).
19. <https://www.youtube.com/watch?v=SIrz-OrTl6Y> (in Russian).
20. Koltzoff N.K. Physikalisch-chemische Grundlage der Morphologie. Biol Zbl 1928; 48(6):345–369.
21. Koltzoff N.K. Studien ueber die Gestalt der Zelle. II. Untersuchungen ueber das Kopfskelett des tierieschen Spermiums. Arch Zellforsch 1908; 2:1–65.

## TO THE 150<sup>TH</sup> ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF N.K. KOLTSOV (1872–1940)

V.S. VOROBYEV

*Psychological Institute of the Russian Academy of Education, Moscow*

A memorial article is presented in connection with the 150<sup>th</sup> anniversary of the birth of a prominent Russian biologist N.K. Koltsov. Earlier in 2010, the magazine had a detailed publication about him. Therefore, many biographical facts are omitted, and the emphasis is on publishing activity, popular science interests, personality traits, individual statements, etc.

*Keywords:* history of biology, N.K. Koltsov, 150<sup>th</sup> anniversary of his birth.

### **Address:**

Vorobyev V.S., Ph.D.

Researcher of Psychological Institute of RAE

E-mail: vorob\_vs@mail.ru

### **Для цитирования:**

Воробьев В.С. К 150-летию со дня рождения Н.К. Кольцова (1872–1940). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(3):103–109.

### **For citation:**

Vorobyev V.S. To the 150<sup>th</sup> anniversary of the birth of N.K. Koltsov (1872–1940). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(3):103–109 (in Russian).

## ПУБЛИКАЦИИ

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022.*

**Аннотация.** Учебник составлен в соответствии с федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования, состоит из восьми книг, шесть из которых тематические. Все книги четко структурированы по унифицированной форме и содержат по четыре главы для удобства использования на практических занятиях и лучшего усвоения материала. В каждой главе изложены цели и задачи овладения знаниями по конкретной теме, приведены теоретический обзор и практические навыки, типовые тестовые вопросы, вопросы для самоконтроля. Курсы практических навыков включают изучение микро- и макропрепаратов, выполнение вербальных и виртуальных лабораторных работ, решение ситуационных задач для закрепления теоретического материала. В издание отдельными книгами включены «Справочно-методические материалы» и «Хрестоматия и дополнительные материалы».

Учебник предназначен студентам медицинских вузов, а также будет полезен для врачей и биологов медицинского профиля в качестве дополнительного и общеобразовательного пособия.

Это общая библиографическая ссылка. Все восемь книг, входящих в состав настоящего издания, имеют отдельные ссылки и снабжены сведениями о структуре каждой из них.

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — Кн. 1. Молекулярная цитология. — 200 с.*

Глава 1. Световая микроскопия. Строение и функция клеточного ядра.

Глава 2. Структурная организация эукариотической клетки. Строение и функция плазматической мембраны.

Глава 3. Закономерности существования клетки во времени.

Глава 4. Половые клетки. Мейоз.

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — Кн. 2. Общая генетика. — 256 с.*

Глава 5. Структура и экспрессия гена.

Глава 6. Закономерности наследования. Мобильные генетические элементы.

Глава 7. Хромосомная теория наследственности. Комбинативная и мутационная изменчивость.

Глава 8. Фенотипическая изменчивость. Эпигенетическая модификация.

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — Кн. 3. Медицинская генетика. — 200 с.*

Глава 9. Клинико-генеалогический метод. Косвенная ДНК-диагностика.

Глава 10. Хромосомы человека. Цитогенетическая диагностика.

Глава 11. Полиморфизм генов. Прямая ДНК-диагностика.

Глава 12. Геном человека. Генная инженерия.

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — Кн. 4. Молекулярная биология развития. — 184 с.*

Глава 13. Общая эмбриология.

Глава 14. Генетика раннего эмбриогенеза.

Глава 15. Филогенетика живых систем.

Глава 16. Генетика и антропология.

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — Кн. 5. Среда обитания человека. — 312 с.*

Глава 17. Неживая природа.

Глава 18. Микроорганизмы вирусы и прокариоты и их переносчики.

Глава 19. Простейшие одноклеточные организмы и их переносчики.

Глава 20. Грибы и грибоподобные организмы.

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — Кн. 6. Медицинская гельминтология. — 200 с.*

Глава 21. Эволюция червей и их симбиотических отношений с человеком.

Глава 22. Трематоды.

Глава 23. Цестоды.

Глава 24. Нематоды.

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — Кн. 7. Справочно-методические материалы. — 184 с.*

*Биология: учебник: в 8 книгах / под ред. Р.Р. Исламова. — Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. — Кн. 8. Хрестоматия и дополнительные материалы. — 496 с.*

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



Подписано к печати 21.09.2022  
Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
Печ. л. 7,0. Тираж 1000 экз.

ООО «ИЛЬПРЕСС»  
105005 Москва, ул. Радио, 23/9, стр. 2