

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

Р.Г. Василов, В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, А.А. Назаренко

Редакционный совет

Ш.О. Бастуабаева (Алмаатинская обл., Республика Казахстан), Р.Р. Исламов (Казань),
М.П. Кирпичников (Москва), Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), С.В. Костров (Москва),
Д.А. Лиознов (Санкт-Петербург), С.В. Нетесов (Новосибирск), Т.В. Овчинникова (Москва),
А.Н. Панин (Москва), В.О. Попов (Москва), Е.Д. Свердлов (Москва),
А.А. Цыганков (Пушино), В.М. Чернов (Казань), А.С. Яненко (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

R.G. Vasilov, V.S. Vorobyev, T.N. Gaeva, A.A. Nazarenko

Editorial council

Sh.O. Bastuabayeva (Alma-Ata region, Republic of Kazakhstan), R.R. Islamov (Kazan),
M.P. Kirpichnikov (Moscow), E.I. Kolomiets (Minsk, Republic of Belarus), S.V. Kostrov (Moscow),
D.A. Lioznov (St. Petersburg), S.V. Netesov (Novosibirsk), T.V. Ovchinnikova (Moscow),
A.N. Panin (Moscow), V.O. Popov (Moscow), E.D. Sverdlov (Moscow),
A.A. Tsygankov (Pushchino), V.M. Chernov (Kazan), A.S. Yanenko (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 5

Оригинальные статьи

Динамика показателей иммунитета биомоделей, иммунизированных стресс-белками *Francisella tularensis*.

С.В. Борисова, О.А. Волох, В.А. Кожевников, А.Л. Кравцов, А.К. Никифоров 6

Сочетанная встречаемость гена холодового шока *csh1* и гена устойчивости к мышьяку *arsB* у *Vibrio cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 серогрупп.

С.О. Водопьянов, А.А. Герасименко, М.И. Ежова, А.В. Евтеев, А.С. Водопьянов, А.М. Горюх, И.П. Олейников, Р.В. Писанов, В.Д. Кругликов, А.Р. Квасов 14

Возможность совместного использования нового бактериального биопрепарата для растениеводства с другими микробными пестицидами.

А.В. Малкова, А.Н. Иркитова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова 22

Создание совместных культур волосовидных корней моркови с микоризным грибом *Rhizophagus irregularis*.

Я.П. Минеев, М.В. Кузнецова, Х.Г. Мусин, Б.Р. Кулуев 28

Создание коллекции фагов патогенных вибрионов и её применение в диагностических и профилактических целях.

М.П. Погужова, Н.Е. Гаевская, А.В. Тюрина, А.О. Аноприенко 37

Изучение бактериофагов, выделенных из полиантибиотикорезистентных бактериальных штаммов возбудителей пневмоний у коронапозитивных больных.

Н.Е. Гаевская, А.О. Аноприенко, М.П. Погужова, А.В. Тюрина, М.В. Цимбалистова 46

Выбор оптимальной питательной среды для глубинного культивирования природных штаммов *Bacillus toyonensis* В-13249 и *Bacillus pumilus* В-13250.

И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова, М.В. Ширманов, А.В. Малкова, Д.Е. Дудник, Е.Н. Каргашилова 54

Влияние пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной на гематологические и биохимические показатели крупного рогатого скота, изученное у телят.

С.В. Польских, В.А. Грызлов, А.А. Иванов 64

In silico анализ особенностей пространственной организации молекул амилаз различного происхождения.

М.Г. Холявка, Д.Ю. Богомолов, В.Г. Артюхов 71

Получение бактериальной пектиново-целлюлозной пленки и изучение ее свойств.

Т.В. Шарова, Т.И. Васильева, Н.А. Кленова, П.А. Панов 81

Обзоры

Технологии культивирования штамма-продуцента противоопухолевой и противовирусной субстанции L-лизин- α -оксидазы из триходермы.

И.П. Смирнова, И.Г. Башкирова 89

Гетерологические системы экспрессии рекомбинантных белков вируса бешенства.

М.А. Ефимова, А.Г. Галева, Ш.М. Насыров 100

Страницы истории. К 100-летию получения Нобелевской премии за открытие инсулина 109

Правила для авторов 111

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Dynamics of immunity indicators of biomodels immunized with *Francisella tularensis* stress proteins.

S.V. Borisova, O.A. Volokh, V.A. Kozhevnikov, A.L. Kravtsov, A.K. Nikiforov..... 6

Combined occurrence of cold-shock gene *csH1* and arsenical resistance gene *arsB* in *Vibrio cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 serogroups.

S.O. Vodopyanov, A.A. Gerasimenko, M.I. Ezhova, A.V. Evteev, A.S. Vodopyanov, A.M. Gorokh, I.P. Oleynikov, R.V. Pisanov, V.D. Kruglikov, A.R. Kvasov..... 14

Possibility of combined use of a new bacillary biopreparation for crop production with other microbial pesticides.

A.V. Malkova, A.N. Irkitova, D.E. Dudnik, E.N. Kargashilova..... 22

Creation of joint cultures of hairy roots of carrots with mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*.

Ya.P. Mineev, M.V. Kuznetsova, Kh.G. Musin, B.R. Kuluev..... 28

Creation of a collection of pathogenic *Vibrio* phages and its application for diagnostic and preventive purposes.

M.P. Pogozhova, N.E. Gaevskaya, A.V. Tyurina, A.O. Anoprienko 37

Study of bacteriophages isolated from polyantibiotic-resistant bacterial strains of pneumonia causes in corona-positive patients.

N.E. Gaevskaya, A.O. Anoprienko, M.P. Pogozhova, A.V. Tyurina, M.V. Tsimbalistova 46

Choice of the optimal nutrient medium for submerged cultivation of natural strains of *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250.

I.Yu. Evdokimov, A.N. Irkitova, M.V. Shirmanov, A.V. Malkova, D.E. Dudnik, E.N. Kargashilova 54

Influence of probiotic feed additive with oyster mushroom mycelium grain on hematological and biochemical parameters of cattle as studied in calves.

S.V. Polskikh, V.A. Gryzlov, A.A. Ivanov 64

In silico analysis of the spatial organization features for amylase molecules of different origins.

M.G. Holyavka, D.Yu. Bogomolov, V.G. Artyukhov 71

Obtaining bacterial pectin-cellulose film and studying its properties.

T.V. Sharova, T.I. Vasilyeva, N.A. Klenova, P.A. Panov 81

Reviews

Technologies of cultivation the strain-producer of antitumor and antiviral substance L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma*.

I.P. Smirnova, I.G. Bashkirova 89

Heterologous expression systems for recombinant rabies virus proteins.

M.A. Efimova, A.G. Galeeva, S.M. Nasyrov 100

Pages of history. On the 100th anniversary of receiving the Nobel Prize for the discovery of insulin 109

Rules for authors 111

К читателям

В третьем номере за 2023 год собраны в основном оригинальные статьи, отличающиеся достаточно широкой методической и актуальной установкой.

Статья С.В. Борисовой с коллегами из Российского противочумного института «Микроб» (Саратов) посвящена исследованию динамики показателей иммунитета биомоделей, иммунизированных стресс-белками *Francisella tularensis*.

Три группы авторов из Ростовского-на-Дону противочумного института преемственно и профессионально развивают свое оригинальное направление. Группа С.О. Водопьянова с коллегами идентифицировала потенциалы генетических детерминант устойчивости к мышьяку и определяла корреляции между их наличием и присутствием гена холодового шока в геномах штаммов *Vibrio cholerae* различных серогрупп и токсигенности. Группа М.П. Погожовой и др. работала над созданием коллекции фагов патогенных вибрионов и ее применением в диагностических и профилактических целях. Группа Н.Е. Гаевской и др. изучала бактериофаги, выделенные из полиантибиотикорезистентных бактериальных штаммов возбудителей пневмоний у коронапозитивных больных.

Авторы из Алтайского государственного университета представили две работы. Одним коллективом (И.Ю. Евдокимов с коллегами) проведен подбор оптимальных питательных сред для глубинного культивирования в условиях биореактора штаммов *Bacillus toyonensis* В-13249 и *Bacillus pumilis* В-13250 из коллекции ИЦ «Промбиотех», выделенных из ризосферы растений Алтайского края. Другой коллектив (А.В. Малкова и др.) исследовал возможность совместного использования нового бациллярного биопрепарата для растениеводства с другими микробными пестицидами.

Исследователями из Уфы (Я.П. Минеев и др.) были получены совместные культуры *R. irregularis* с волосовидными корнями моркови и осуществлен их микроскопический анализ на разных стадиях микоризации.

Группа авторов из Воронежского государственного аграрного университета (С.В. Польских и др.) определяла влияние пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной на гематологические и биохимические показатели телят.

Работники Воронежского государственного университета М.Г. Холявка, Д.Ю. Боголюбов, В.Г. Артюхов осуществили обстоятельный анализ пространственной организации молекул амилаз различного происхождения.

Т.В. Шарова с соавторами из Самарского национального исследовательского университета им. С.П. Королева разработали метод получения бактериальной пектиново-целлюлозной пленки.

В заключение приведены два ценных обзора. Первый посвящен технологиям культивирования штамма-продуцента F-180 противоопухолевого и антивирусного фермента L-лизин-альфа-оксидазы из триходермы (И.П. Смирнова, И.Г. Башкирова, Российский университет дружбы народов, Всероссийский центр карантина растений). В обзоре казанских ученых (М.Ф. Ефимова с коллегами) проанализированы гетерологические системы экспрессии рекомбинантных белков вируса бешенства.

В исторической рубрике в связи со 100-летием вручения Нобелевской премии первооткрывателям инсулина Бантингу и Маклеоду помещены краткие выдержки из Нобелевской речи Бантинга.

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

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНИТЕТА БИМОДЕЛЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ СТРЕСС-БЕЛКАМИ *FRANCISELLA TULARENSIS*

С.В. БОРИСОВА*, О.А. ВОЛОХ, В.А. КОЖЕВНИКОВ, А.Л. КРАВЦОВ, А.К. НИКИФОРОВ

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

Для инактивации механизмов естественной противоинойфекционной резистентности организма-хозяина и минимизации вреда от воздействия окружающей среды возбудитель туляремии обладает детерминантами устойчивости, к которым, в частности, относятся стресс-белки. Актуальным направлением исследования биологии данного возбудителя является изучение иммунобиологической активности нативных секретируемых стресс-белков *Francisella tularensis*. Статья посвящена исследованию динамики показателей иммунитета биомоделей после иммунизации препаратами Bfr, HSP, GroEl/GroEs, полученными при культивировании штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в стресс-условиях. Показано, что ни один из антигенов не был токсичен для животных и не вызывал острой воспалительной реакции. Установлено, что все препараты секретируемых стресс-белков обладают выраженной иммуногенностью и высокой протективной активностью для лабораторных животных; максимальная иммуномодулирующая активность отмечена у белка Bfr. Однократная иммунизация препаратами стресс-белков способствует выживанию мышей при экспериментальной туляремии, вызванной вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840. Высокий индекс иммунитета у всех групп иммунизированных животных при отсутствии повреждающего действия на организм биомоделей свидетельствует о возможности использования секретируемых стресс-белков туляремийного микроба при разработке новых профилактических препаратов.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, стресс-белки, GroEl/GroEs, HSP, бактериоферритин, иммуногенность, протективность.

Введение

Туляремия — зоонозная природно-очаговая особо опасная инфекция, вызываемая *Francisella tularensis*, относящейся ко II группе патогенности. В настоящее время сохраняется неблагоприятная обстановка по заболеваемости туляремией в России и мире [8, 20]. Эпидемиологические риски возникновения случаев заболевания среди восприимчивого населения связаны со стабильностью природных очагов инфекции [15], которые, в свою очередь, определяются биологическими особенностями туляремийного микроба. Возбудитель туляремии обладает детерминантами устойчивости, которые направлены на инактивацию механизмов естественной противоинойфекционной резистентности и минимизируют вред от внешнего

воздействия [3, 17, 18]. В этом аспекте наибольший интерес вызывают антигены, которые секретируются в окружающую среду и выполняют важнейшие функции по защите клетки от воздействия патоген-нейтрализующих механизмов хозяина, а также при взаимодействии с его иммунной системой, определяя характер иммунного ответа [1, 13]. К таким, в частности, относятся белки теплового шока GroEl/GroEs и HSP, равно как и железо-ассоциированный белок бактериоферритин (Bfr) [3]. В частности, Lee B.Y. с соавт. [14] в пуле белков, полученных из безмикробного фильтрата после культивирования туляремийного микроба, определили методом 2Dфореза наличие таких белков, как Bfr, GroEl, DnaK.

В настоящее время свойства стресс-белков изучают опосредованно: с использованием мутантных штаммов [12] и рекомбинантных вариантов белков. Большое количество работ посвящено получению рекомбинантных стресс-белков туляремийного микроба с использованием экспрессионной системы *E. coli* [14, 16]. Однако данные белки, обладая высокой иммунологической активностью [6], имели сниженную иммуногенность и не защищали от гибели при заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* [16].

© 2023 г. Борисова С.В., Волох О.А., Кожевников В.А., Кравцов А.Л., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

Борисова Светлана Владимировна
младший научный сотрудник отдела профилактических препаратов,
Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора, Саратов,
E-mail: BorisovaS.Microbe@yandex.ru

Изучение иммунобиологической активности секретируемых стресс-белков является актуальным направлением исследования биологии возбудителя туляремии и определения их прикладного потенциала. В настоящей работе представлен анализ иммунобиологических свойств нативных стресс-белков, полученных при культивировании штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в условиях температурного и перекисного стресса.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали штаммы *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов института «Микроб»). Электрофоретический анализ проводили в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по методу U.K. Laemmli (1970) в камере для вертикального электрофореза Mini-Protean (BioRad) с последующим окрашиванием на белки Кумасси ярко-синим R-250. Молекулярные массы белков определяли по их электрофоретической подвижности (Rf) с помощью гель-документирующей системы GelDoc™XR+ (BioRad) и программы ImageLab™. Вестерн-блот проводили по методу H. Towbin (1979). В качестве антисыворотки использовали сыворотку диагностическую туляремийную (ИркутскНИПЧИ).

Содержание белка определяли по методу O.H. Lowry (1951) с применением набора реактивов «BioRad DC Protein Assay» (BioRad) и использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта при 660 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific). Количество липидов определяли бихроматным методом при 650 нм [10]. Углеводную составляющую в выделенных антигенах определяли реакцией Молиша с применением глюкозы в качестве стандарта при 509 нм [11].

Анализ иммуногенности препаратов проводили на белых мышцах линии Balb/c 19±1 г. и морских свинках 260±10 г. Работу с животными осуществляли в соответствии с руководством и правилами по обращению, уходу и защите лабораторных животных. Все протоколы испытаний на животных были одобрены Комиссией по биоэтике института «Микроб». Во всех экспериментах строго соблюдались условия, предъявляемые к проведению экспериментальных исследований на животных.

Токсичность стресс-белков оценивали в тесте на белых мышцах и морских свинках при внутрибрюшинном введении в количестве 100 мкг и 1000 мкг соответственно. Контрольным животным в обоих случаях вводили

равный объем 0,86%-ного раствора NaCl. В эксперименте животных взвешивали до опыта и ежедневно во время наблюдения в течение 14 суток.

Постановку и учет реакции лейкоцитоза осуществляли согласно методическим указаниям «Эпидемиологический надзор за туляремией» [МУ 3.1.2007-05]. Морских свинок иммунизировали препаратами антигенов однократно подкожно в дозе 500 мкг. Учет проводили на 7-, 14-, 21-, 30-е сутки после иммунизации. В качестве контроля использовались интактные животные. Положительным результатом служили показатели коэффициента лейкоцитоза (К, %) выше 16%.

Для изучения иммуногенной активности стресс-белков туляремийного микроба мышей линии Balb/c иммунизировали антигенами подкожно однократно в концентрации 20 мкг/животное. На 3-, 7-, 14-, 21-, 30-е сутки после введения препаратов у животных проводили забор крови, легких и селезенки для определения титров специфических туляремийных антител в сыворотке и органах к антигенам Bfr, HSP, GroEl/GroEs методом твердофазного ИФА. В качестве сенситина использовали тулярин, в качестве конъюгата — антитела диагностические мышьяные, меченные пероксидазой хрена. Субстратным раствором служил 0,04% ABTS. Положительным контролем была мышьяная сыворотка к *F. tularensis*, заведомо содержащая соответствующие антитела, а отрицательным контролем — сыворотки интактных мышей.

Изучение протективных свойств антигенов проводили на модели белых мышей линии Balb/c. Для определения средней иммунизирующей дозы животных иммунизировали однократно подкожно дозами от 1,5 до 96 мкг с шагом 4, с последующим заражением вирулентным штаммом голарктического подвида *F. tularensis* 503/840 (1 Dcl = 1 м.к.) на 21-е сутки в дозе 100 Dcl. Напряженность иммунитета определяли заражением животных вирулентным штаммом туляремийного микроба в дозе от 1 до 1000 м.к., предварительно иммунизированных антигенами в дозировке 20 мкг. Индекс иммунитета рассчитывали по отношению LD₅₀ для иммунизированных мышей к LD₅₀ интактных животных. Всех погибших или усыпленных хлороформом животных вскрывали для оценки развития специфического инфекционного процесса.

Влияние антигенов туляремийного микроба на показатели апоптоза и пролиферации спленоцитов морских свинок исследовали через 7, 14, 21 и 30 суток после иммунизации стресс-белками *F. tularensis* в концентрации 500 мкг. Спленоциты получали общепринятыми методами [9] и анализировали на проточном цитофлуориметре CyAn (Beckman Coulter) после окрашивания раствором, со-

держащим 50 мкг/мл пропидия йодида. В тесте *in vitro* определяли влияние стресс-белков на показатели индуцированного апоптоза с внесением в лейкоцитарную взвесь тулярина в конечной концентрации 5×10^8 м.к. Пробы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 4 часов. Отрицательным контролем служили аналогичные пробы клеток интактных животных.

Вся работа проводилась в соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel. Статистическую значимость оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости $\alpha < 0,05$, а также с использованием метода Каплана—Мейера.

Результаты и обсуждение

Культуру *F. tularensis* 15 НИИЭГ выращивали при 37 °С в течение 20 часов в бульоне Мюллера—Хинтона (HiMedia). В фазе экспоненциального роста клетки туляремийного микроба подвергали воздействию температурного и перекисного стресса, описанного нами ранее [4]. В работе использовали выделенные из обеспложенной стерилизующей фильтрацией (0,22 мкм) культуральной жидкости хроматографически очищенные препараты антигенов: белки теплового шока (GroEL, Bfr) и комплекс белков-шаперонов (HSP).

По данным SDS-PAGE и иммуноблоттинга (рис. 1), полученные препараты имели иммунореактивные мажорные полосы: Bfr — 10 кДа, GroEL/GroES — 57 и 10 кДа, что соответствует данным литературы [14]. Комплекс HSP в своем составе имел 5 мажорных белковых фракций с молекулярными массами от 10 до 95 кДа [19]. Сравнительный анализ химического состава показал, что при исходной концентрации белка 1 мг углеводы в процентном соотношении составляли у Bfr — 3%, у GroEL/GroES — 15,6%, у HSP — 32,5%. Липидная составляющая у GroEL и Bfr отсутствовала, а у HSP составила 13,5%.

При определении токсического воздействия препаратов стресс-белков на организм биомоделей установлено, что при однократном внутрибрюшинном введении антигенов биомоделям в течение 14 дней не наблюдалось гибели животных, снижения массы тела, образования воспалительных экссудатов и некробиотических изменений. Поскольку возбудитель туляремии является внутриклеточным патогеном, можно предположить, что

отсутствие токсической реакции на данные стресс-белки способствует адаптации микроба при инфекционном процессе и является одним из важных факторов персистенции в организме хозяина.

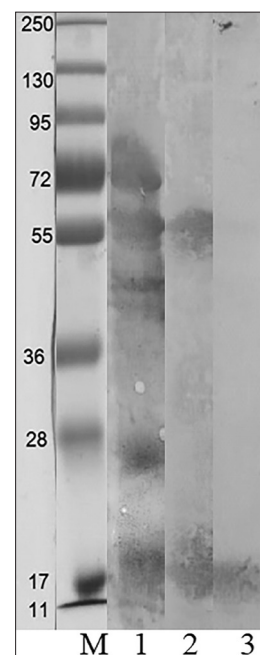


Рис. 1. Иммуноблоттинг антигенов туляремийного микроба. М — маркеры молекулярной массы PageRuler («Fermentas»); 1 — комплекс стресс-белков HSP; 2 — GroEL/GroES; 3 — Bfr

Был проведен анализ влияния однократной иммунизации животных препаратами Bfr, GroEL/GroES, HSP на показатели апоптоза и пролиферации, а также на изменение показателей реакции лейкоцитоллиза.

При оценке гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок, иммунизированных стресс-белками туляремийного микроба, была отмечена волнообразная динамика показателей реакции лейкоцитоллиза с максимумом на 14-е сутки иммуногенеза (табл. 1) и снижением к 30 суткам до отрицательных значений. Но, в отличие от других антигенов, HSP на 30-е сутки имел слабopоложительный показатель лейкоцитоллиза. Положительный аллергический ответ у животных, иммунизированных стресс-белками *F. tularensis*, свидетельствует об их высокой иммуногенности.

Важным показателем, позволяющим оценить влияние антигенов на иммунную систему, является соотношение иммунокомпетентных клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла. В связи с этим были изучены пролиферативная и апоптотическая активности спленоцитов морских свинок, иммунизированных стресс-белками *F. tularensis* 15 НИИЭГ на разных

сроках наблюдения (см. табл. 1). Показано, что на всех сроках соотношение клеток селезенки в стадии апоптоза и пролиферации не превышало единицы (от 0,07 до

0,31), что свидетельствует об отсутствии повреждающего действия стресс-белков на иммунокомпетентные клетки и коррелирует с ранее полученными результатами [2].

Таблица 1

Влияние антигенов туляремийного микроба на распределение спленоцитов морских свинок по клеточному циклу в процессе иммуногенеза

| Иммунизирующий препарат | Сроки иммуногенеза (сутки) | Апоптотические клетки ($M \pm m$, %) | Пролиферирующие клетки ($M \pm m$, %) | Соотношение числа клеток на стадии апоптоза и пролиферации | K, % |
|-------------------------|----------------------------|--|---|--|-------|
| Bfr | 7 | 4,3±0,96 | 24,4±1,24 | 0,18 | 10 |
| | 14 | 4,0±0,62 | 27,3±1,99 | 0,18 | 42,8 |
| | 21 | 2,5±0,75 | 24,6±1,46 | 0,1 | 15,3 |
| | 30 | 2,6±0,07 | 21,7±0,99 | 0,1 | 12,5 |
| GroEl | 7 | 5,8±0,64 | 18,5±0,75 | 0,31 | 11,4 |
| | 14 | 4,6±0,46 | 25,1±1,08 | 0,18 | 23,8 |
| | 21 | 8,2±0,49 | 12,3±1,24 | 0,07 | 12,2 |
| | 30 | 6,5±0,88 | 21,9±0,4 | 0,3 | 9,6 |
| HSP | 7 | 4,8±0,13 | 16,9±0,51 | 0,28 | 9,7 |
| | 14 | 5,0±0,66 | 18,3±1,26 | 0,27 | 38,09 |
| | 21 | 3,8±0,09 | 18,7±1,37 | 0,2 | 16,8 |
| | 30 | 4,9±0,31 | 23,8±0,68 | 0,21 | 25,4 |
| Контроль | - | 2,7±0,29 | 15,4±2,22 | 0,17 | 12,6 |

При изучении антительного ответа в сыворотке крови и внутренних органах белых мышей (табл. 2) было найдено, что начиная с 14 суток во всех видах биоматериалов от животных нарастал титр специфических туляремийных антител. При иммунизации животных белком Bfr антитела регистрировались в ранние сроки — с 3-го дня наблюдений, их уровень нарастал на протяжении всего срока наблюдений и к 30-му дню

(срок наблюдения) достигал максимума. Аналогичная динамика наблюдались в сыворотках крови животных, иммунизированных другими антигенами (HSP, GroEl/GroEs), но активное нарастание уровня антител происходило позже — только на 14-е сутки. В суспензиях внутренних органов также отмечено увеличение антительного ответа, но его уровень был ниже, независимо от иммунизирующего препарата.

Таблица 2

Динамика антительного ответа в сыворотке крови и суспензиях внутренних органов мышей линии Balb/c после однократной иммунизации препаратами стресс-белков *F. tularensis* (ИФА, реципрокный титр)

| Препарат | Сыворотка крови | | | | | Легкие | | | | | Селезенка | | | | |
|-----------------|-----------------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-----------|-------|--------|--------|--------|
| | 3 сут | 7 сут | 14 сут | 21 сут | 30 сут | 3 сут | 7 сут | 14 сут | 21 сут | 30 сут | 3 сут | 7 сут | 14 сут | 21 сут | 30 сут |
| Bfr | 160 | 320 | 320 | 320 | 2560 | 10 | 80 | 40 | 160 | 320 | 40 | 20 | 80 | 320 | 320 |
| GroEl/ GroEs | 80 | 80 | 640 | 640 | 320 | 10 | 20 | 20 | 320 | 320 | отр | 10 | 20 | 320 | 320 |
| HSP | 80 | 80 | 320 | 320 | 320 | отр | 20 | 80 | 320 | 160 | отр | отр | отр | 160 | 320 |

Определение протективной активности экспериментальных серий вакцины проводили на белых мышах Balb/c обоего пола (масса 18–20 г), поскольку мышьяная модель экспериментальной туляремии в настоящее время широко используется при проведении иммунологических исследований [7]. На первом этапе была определена средняя иммунизирующая доза для каждого антигена при экспериментальной туляремии, вызванной *F. tularensis* 503/840 в дозе 100 Dcl (табл. 3). Установлено, что однократная иммунизация приводит к увеличению продолжительности жизни животных по сравнению с контрольной группой. Анализ протективных свойств стресс-белков туляремиального микроба на модели белых мышей продемонстрировал, что однократная подкожная иммунизация стресс-белками *F. tularensis* увеличивает продолжительность жизни биомоделей больше чем в

два раза при заражении их вирулентным штаммом этого микроорганизма.

Далее определяли напряженность иммунитета при заражении предварительно иммунизированных антигенами в дозе 20 мкг животных вирулентным штаммом туляремиального микроба в дозе от 1 до 1000 м.к. с шагом 10. Результаты экспериментов, расчеты LD₅₀ и индекса иммунитета представлены в таблице 3. Отмечено кратное повышение показателя средней летальной дозы для иммунных животных по сравнению с контрольной группой. Высокие показатели индекса иммунитета для всех групп иммунизированных мышей подтверждают протективные свойства изучаемых препаратов секретлируемых стресс-белков и свидетельствует об их потенциале в качестве компонентов профилактических препаратов.

Таблица 3

Иммуногенность антигенов туляремиального микроба для белых мышей линии Balb/c при экспериментальной туляремиальной инфекции, заражение *Francisella tularensis* 503/840

| Препарат | ED ₅₀ , мкг | Δt, сут | LD ₅₀ , м. кл. | ИИ |
|-------------|------------------------|----------|---------------------------|------|
| HSP | 45,97 | 17,6±0,8 | 464 | 232 |
| Bfr | 15,7 | 18±1 | 147 | 73,5 |
| GroEl/GroEs | 31 | 15,5±0,5 | 316 | 158 |
| Контроль | - | 7,2±0,2 | 2 | - |

Примечание: ED₅₀ — средняя иммунизирующая доза; Δt, сут. — средняя продолжительность жизни животных в группе

Для изучения влияния туляремиальных антигенов на выживаемость животных иммунизировали однократно подкожно препаратами HSP, Bfr, GroEl/GroEs в дозе, равной 20 мкг для каждого антигена, после чего на 21-е сутки заражали 100 м.к. вирулентного штамма *F. tularensis* 503/840. Для анализа данных использовали

метод Каплана—Мейера [5]. На рисунке 2 показано, что иммунизация, независимо от используемого антигена, приводила к увеличению продолжительности жизни и более чем 50% выживаемости животных при 100% гибели контрольной группы на 6–8-е сутки после заражения.

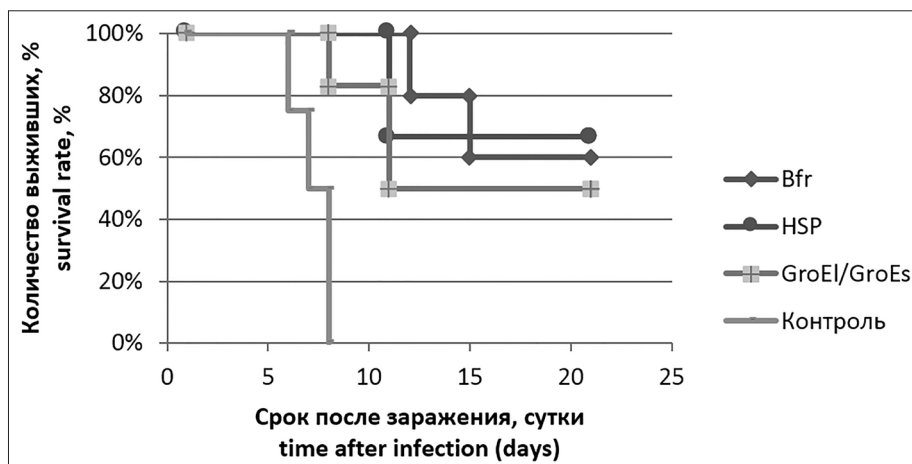


Рис. 2. Выживаемость белых мышей, иммунизированных стресс-белками туляремиального микроба, после заражения 100 м.к. вирулентного штамма *F. tularensis* 503/840. Кривая выживаемости Каплана—Мейера, по оси абсцисс — время после заражения (дни), наблюдение в течение 21 суток; по оси ординат — выживаемость (процент выживших животных в группе от общего количества животных)

Заключение

Таким образом, в процессе исследования иммунобиологических свойств секретируемых антигенов вакцинного штамма туляремиального микроба было установлено, что все препараты обладают выраженной иммуногенностью, высокой протективной активностью для лабораторных животных и не приводят к значительному повреждению иммунокомпетентных клеток. По результатам проведенных иммунологических тестов, максимальной иммуномодулирующей активностью обладает белок Vfr.

Исследуемые антигены являются высокоиммуногенными компонентами туляремиального микроба, и определение антител к ним может использоваться как компоненты диагностикумов. За счет же их ярко выраженного протективного действия данные стресс-белки могут служить основой при конструировании вакцинных препаратов.

Дальнейшие исследования стресс-белков туляремиального микроба дадут возможность расширить представление об их свойствах и стать основой практического использования этих белков в качестве компонентов диагностических и профилактических препаратов.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФКУН Противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора Н.Г. Авдеевой, Ю.И. Самохваловой, С.А. Воробьевой, О.С. Дураковой за помощь при организации и проведении исследования.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Литература

1. Бондаренко В.М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса // Журн. микробиол. — 1999. — № 5. — С. 34–39.
2. Борисова С.В., Волох О.А., Кравцов А.Л., Кожевников В.А. Оценка иммунобиологических свойств стресс-белков туляремиального микроба // Национальные приоритеты России. — 2021. — Т. 3. — № 42. — С. 116–119.

3. Борисова С.В., Волох О.А. Детерминанты устойчивости *Francisella tularensis* к стрессовым условиям окружающей среды // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2022. — Т. 99. — № 3. — С. 362–371.
4. Борисова С.В., Кузнецова Е.М., Ерохин П.С., Волох О.А. Применение нового инструментального метода для оценки функционального состояния клеток *Francisella tularensis* в стрессовых условиях // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. — 2019. — Т. 19. — № 3. — С. 326–330.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1998. — 460 с.
6. Горбатов А.А., Панферцев Е.А., Титарева Г.М. Использование цитоплазматического белка FTT1696 для комплексной серодиагностики туляремии и оценки эффективности вакцинации // Инфекция и иммунитет. — 2017. — № 8. — С. 991.
7. Комбарова Т.И., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Борзилов А.И., Коробова О.В., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Мокриевич А.Н. Сравнительная оценка реактогенности туляремиальной вакцины на различных биомоделях // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2013. — Т. 71. — № 4. — С. 54–62.
8. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Куликалова Е.С., Холин А.В., Мазепа А.В., Борзенко М.А., Пичурина Н.Л., Павлович Н.В., Носков А.К., Транквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Множественная лекарственная устойчивость клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica*, анализ эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации в 2022 г. и прогноз на 2023 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2023. — № 1. — С. 37–47.
9. Фримель Г. Иммунологические методы. — М.: Медицина, 1987. — 374 с.
10. Amenta J. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid Res. — 1964. — Vol. 5. — P. 270–272.
11. Foulger J.H. The user of the Molisch (α -Naphthol) reactions in the study of sugars in biological fluids // J. Biol. Chem. — 1931. — Vol. 92. — P. 345–353.
12. Grall N., Livny J., Waldor M., Barel M., Charbit A., Meibom K.L. Pivotal role of the *Francisella tularensis* heat-shock sigma factor RpoH // Microbiology. — 2009. — Vol. 155. — No. 8. — P. 2560–2572.
13. Klinman D.M., Conover J., Coban C. Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection // Infect. Immun. — 1999. — Vol. 67. — No. 11. — P. 5658–5663.
14. Lee B.Y., Horwitz M.A., Clemens D.L. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis* // Infection and Immunity. — 2006. — Vol. 74. — P. 4002–4013.

15. Rouco C., Luque-Larena J.J., Vidal D., Mougeot F. Vole outbreaks may induce a tularemia disease pit that prevents Iberian hare population recovery in NW Spain // *Sci. Rep.* – 2023. – Vol. 8. – No. 13. – P. 3898.
16. Sheshko V., Link M., Golovliov I., Balonova L., Stulik J. Utilization of a tetracycline-inducible system for high-level expression of recombinant proteins in *Francisella tularensis* LVS // *Plasmid.* – 2021. – Vol. 115. – Art.102564. doi: 10.1016/j.plasmid.2021.102564.
17. Steiner D.J., Furuya Y., Metzger D.W. Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity // *Infect. Drug Resist.* – 2014. – No. 7. – P. 239–251.
18. Travis B.A., Ramsey K.M., Prezioso S.M., Tallo T., Wandzilak J.M., Hsu A. et al. Structural basis for virulence activation of *Francisella tularensis* // *Mol. Cell.* – 2021. – Vol. 81. – No. 1. – P. 139–152.
19. Urban-Chmiel R., Dec M., Puchalski A., Wernicki A. Characterization of heat-shock proteins in *Escherichia coli* strains under thermal stress in vitro // *J. Med. Microbiol.* – 2013. – Vol. 62. – No. 12. – P. 1897–1901.
20. Yeni D.K., Büyük F., Ashraf A., Shah M.S.U.D. Tularemia: a re-emerging tick-borne infectious disease // *Folia Microbiol. (Praha).* – 2021. – Vol. 66. – No. 1. – P. 1–14.
- senka reaktogenosti tulyaremiynoy vaksiny na razlichnykh biomodelyakh. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika* 2013; 71(4):54–62 (in Russian).
8. Kudryavtseva TYu, Popov VP, Mokriyevich AN, Kulikalova YeS, Kholin AV, Mazepa AV, Borzenko MA, Pichurina NL, Pavlovich NV, Noskov AK, Trankvilevskiy DV, Khramov MV, Dyatlov IA. Mnozhestvennaya lekarstvennaya ustoychivost' kletok *F. tularensis subsp. holarctica*, analiz epizootologicheskoy i epidemiologicheskoy situatsii po tulyaremii na territorii Rossiyskoy Federatsii v 2022 g. i prognoz na 2023 g. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2023;1:37–47 (in Russian).
9. Frimel' G. Immunologicheskiye metody. Moscow: Meditsina, 1987: 374 (in Russian).
10. Amenta J. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography. *J Lipid Res* 1964; 5:270–272.
11. Foulger JH. The user of the Molisch (α -Naphthol) reactions in the study of sugars in biological fluids. *J Biol Chem* 1931; 92:345–353.
12. Grall N, Livny J, Waldor M, Barel M, Charbit A, Meibom KL. Pivotal role of the *Francisella tularensis* heat-shock sigma factor RpoH. *Microbiology* 2009; 155(8):2560–2572.
13. Klinman DM, Conover J, Coban C. Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect. Immun* 1999; 67(11):5658–5663.
14. Lee BY, Horwitz MA, Clemens DL. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity* 2006; 74:4002–4013.
15. Rouco C, Luque-Larena JJ, Vidal D, Mougeot F. Vole outbreaks may induce a tularemia disease pit that prevents Iberian hare population recovery in NW Spain. *Sci Rep* 2023; 8(13):3898.
16. Sheshko V, Link M, Golovliov I, Balonova L, Stulik J. Utilization of a tetracycline-inducible system for high-level expression of recombinant proteins in *Francisella tularensis* LVS. *Plasmid* 2021; 115:102564. doi: 10.1016/j.plasmid.2021.102564.
17. Steiner DJ, Furuya Y, Metzger DW. Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infect Drug Resist* 2014(7):239–251.
18. Travis BA, Ramsey KM, Prezioso SM, Tallo T, Wandzilak JM, Hsu A et al. Structural basis for virulence activation of *Francisella tularensis*. *Mol. Cell* 2021; 81(1):139–152.
19. Urban-Chmiel R, Dec M, Puchalski A, Wernicki A. Characterization of heat-shock proteins in *Escherichia coli* strains under thermal stress in vitro. *J Med Microbiol* 2013; 62(12):1897–1901.
20. Yeni DK, Büyük F, Ashraf A, Shah MSUD. Tularemia: a re-emerging tick-borne infectious disease. *Folia Microbiol (Praha)* 2021; 66(1):1–14.

References

1. Bondarenko VM. Faktory patogennosti bakteriy i ikh rol' v razvitií infektsionnogo protsessa. *Zhurn. mikrobiol* 1999; 5:34–39 (in Russian).
2. Borisova SV, Volokh OA, Kravtsov AL, Kozhevnikov VA. Otsenka immunobiologicheskikh svoystv stress-belkov tulyaremiynogo mikroba. *Natsional'nyye priority Rossii* 2021; 3(42):116–119 (in Russian).
3. Borisova SV, Volokh OA. Determinanty ustoychivosti *Francisella tularensis* k stressovym usloviyam okruzhayushchey sredy. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2022; 99(3):362–371 (in Russian).
4. Borisova SV, Kuznetsova YeM, Yerokhin PS, Volokh OA. Primeneniye novogo instrumental'nogo metoda dlya otsenki funktsional'nogo sostoyaniya kletok *Francisella tularensis* v stressovykh usloviyakh. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya* 2019; 19(3):326–330 (in Russian).
5. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow: Praktika, 1998: 460 (in Russian).
6. Gorbatov A.A., Panfertsev Ye.A., Titareva G.M. Ispol'zovaniye tsitoplazmaticheskogo belka FTT1696 dlya kompleksnoy serodiagnostiki tulyaremii i otsenki effektivnosti vaksinatсии. *Infektsiya i immunitet* 2017; S: 991 (in Russian).
7. Kombarova TI, Pavlov VM, Kravchenko TB, Titareva GM, Bakhteyeva IV, Borzilov AI, Korobova OV, Vakhrameyeva GM, Mironova RI, Mokriyevich AN. Sravnitel'naya ot-

DYNAMICS OF IMMUNITY INDICATORS OF BIOMODELS IMMUNIZED WITH FRANCISELLA TULARENSIS STRESS PROTEINS

S.V. BORISOVA, O.A. VOLOKH, V.A. KOZHEVNIKOV, A.L. KRAVTSOV, A.K. NIKIFOROV

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

In order to inactivate the mechanisms of natural anti-infective resistance of the host organism and minimize the harm from environmental exposure, the causative agent of tularemia has resistance determinants, specifically, stress proteins. The study of the immunobiological activity of *Francisella tularensis* native secreted stress proteins is a relevant research area in investigation of the biology of this pathogen. This work is devoted to the study of the immunity indicator dynamics of biomodels after immunization with Bfr, HSP, GroEL/GroES preparations obtained by cultivating the strain *F. tularensis* 15 NIIEG under stress conditions. It is shown that none of the antigens was toxic to animals and did not cause an acute inflammatory reaction. It has been found that all preparations of secreted stress proteins have pronounced immunogenicity and high protective activity for laboratory animals; the maximum immunomodulatory activity is noted in the Bfr protein. Single immunization with tularemia microbe stress protein preparations contributes to the survival of mice with experimental tularemia caused by the virulent *F. tularensis* 503/840 strain. The high immunity index in all groups of immunized animals in the absence of a damaging effect on the body of biomodels indicates the possibility of using secreted stress proteins of the tularemia in the development of new preventive drugs.

Keywords: *Francisella tularensis*, stress proteins, GroEl/GroEs, HSP, bacterioferritin, immunogenicity, protective activity.

Address:

Borisova S.V.
Junior Researcher department of preventive drugs, Russian
Research Anti-Plague Institute Microbe, Rospotrebnadzor,
Saratov
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Для цитирования:

Борисова С.В., Волох О.А., Кожевников В.А., Кравцов А.Л., Никифоров А.К. Динамика показателей иммунитета биомоделей, иммунизированных стресс-белками *Francisella tularensis*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3):6–13.

For citation:

S.V. Borisova, O.A. Volokh, V.A. Kozhevnikov, A.L. Kravtsov, A.K. Nikiforov Dynamics of immunity indicators of biomodels immunized with *Francisella tularensis* stress proteins. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3):6–13 (in Russian).

СОЧЕТАННАЯ ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ГЕНА ХОЛОДОВОГО ШОКА *CSH1* И ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К МЫШЬЯКУ *ARSB* У *VIBRIO CHOLERAЕ* O1, O139, NONO1/NONO139 СЕРОГРУПП

С.О. ВОДОПЬЯНОВ¹, А.А. ГЕРАСИМЕНКО^{1*}, М.И. ЕЖОВА¹, А.В. ЕВТЕЕВ¹,
А.С. ВОДОПЬЯНОВ¹, А.М. ГОРОХ¹, И.П. ОЛЕЙНИКОВ¹, Р.В. ПИСАНОВ¹,
В.Д. КРУГЛИКОВ¹, А.Р. КВАСОВ²

¹ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,

²ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России,
Ростов-на-Дону

Цель исследования заключалась в идентификации потенциальных генетических детерминант устойчивости к мышьяку и в определении корреляции между их наличием и присутствием гена холодового шока в геномах штаммов *Vibrio cholerae* различных серогрупп и токсигенности. В анализе применены методы полногеномного секвенирования с использованием биоинформационного анализа авторскими программами, а также ПЦР-анализ со статистической обработкой полученных результатов в каждом случае. В результате биоинформационного анализа 553 полногеномных сиквенсов музейных штаммов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 с различной токсигенностью и ПЦР-анализа 167 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*-, выделенных из поверхностных водоемов в ходе мониторинга холеры в г. Ростове-на-Дону в 2022 году, у нетоксигенных вибрионов O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп идентифицирован ген *arsB*, кодирующий протеин ACR3, детерминирующий устойчивость к токсическому действию мышьяка. Установлена статистически достоверная связь между встречаемостью гена *arsB* и гена холодового шока *csH1* у нетоксигенных штаммов секвенированных геномов *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных из поверхностных водоемов и проанализированных в ПЦР. Показано отсутствие гена *arsB* у изученных *ctxAB*+ штаммов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139. Высказано предположение о том, что сочетание генов устойчивости к мышьяку *arsB* и холодового шока *csH1* способствует персистенции штаммов *V. cholerae* в водных объектах окружающей среды.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, токсигенные штаммы, нетоксигенные штаммы, холодовой шок, ген *csH1*, устойчивость к мышьяку, ген *arsB*.

Введение

Холерный вибрион является патогеном, для которого характерен, прежде всего, водный путь передачи. Систематическое выделение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* из поверхностных водоемов на территории Российской Федерации в процессе мониторинга холеры [6, 7] указывает на возможное существование у этих культур дополнительных факторов, обуславливающих их персистенцию [5, 9]. Геном возбудителя холеры является

чрезвычайно пластичным, в нем постоянно регистрируют изменения, приводящие к формированию штаммов, в том числе с повышенной вирулентностью и способностью к адаптации к условиям внешней среды [8, 9, 18].

Характерной особенностью территории нашей страны, в отличие от эндемичных по холере регионов, является низкая температура осенне-зимнего периода; поэтому в число потенциальных детерминант персистенции должны входить факторы, обуславливающие выживание возбудителя при низкой температуре. Так, ген холодового шока *csH1* был идентифицирован у нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1 серогруппы. Наличие этого гена, вероятно, способствует обеспечению выживания этих микроорганизмов при низкой температуре окружающей среды [1].

Антропогенное загрязнение внешней среды, вызванное усиленной индустриализацией, приобрело глобальный характер и оказывает огромное влияние на

© 2023 г. Водопьянов С.О., Герасименко А.А., Ежова М.И., Евтеев А.В., Водопьянов А.С., Горох А.М., Олейников И.П., Писанов Р.В., Кругликов В.Д., Квасов А.Р.

* Автор для переписки:

Герасименко Артем Александрович
младший научный сотрудник, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону
E-mail: gerasimenko_aa@antiplague.ru

качество воды. Одними из важнейших загрязнителей являются тяжелые металлы, поступающие во внешнюю среду с промышленными и городскими отходами [16, 19].

Вода, загрязненная тяжелыми металлами, может выступать как отдельный селективный фактор, способствующий приобретению водными микроорганизмами механизмов защиты от их токсического воздействия. Наиболее типичным эволюционным ответом явилось приобретение микроорганизмами генетических детерминант, обуславливающих резистентность к токсическому воздействию. В ряде случаев гены резистентности были идентифицированы в составе мобильных генетических элементов [22].

Проблема резистентности вибрионов к тяжелым металлам в последнее десятилетие привлекла внимание исследователей. Так, для *Vibrio parahaemolyticus* показано приобретение резистентности к тяжелым металлам и идентифицирован ряд генетических детерминант, обеспечивающих толерантность к кадмию, меди, цинку [16], кобальту, меди [17]. В ряде случаев выявлена множественная устойчивость к нескольким металлам [14]. Описаны факторы устойчивости *V. cholera*: к ртути и хрому [24]; ртути, цинку, свинцу [25]; ртути, никелю, кадмию [15]; меди, серебру [13]; мышьяку [12]. В этом плане особую озабоченность вызывает повышенное содержание мышьяка (As) в водных объектах на территориях, где стабильно регистрируют циркуляцию возбудителя холеры [20, 23]. По данным И.В. Кораблиной с соавт., в период 2016–2018 гг. при мониторинге накопления тяжелых металлов в гидробионтах пресноводных водоемов были зафиксированы высокие концентрации мышьяка в рыбах, выловленных в Краснодарском крае [4].

Цель настоящей работы заключалась в идентификации потенциальных генетических детерминант устойчивости к мышьяку и в определении корреляции между их наличием и присутствием гена холодового шока в геномах штаммов *V. cholerae* различных серогрупп и токсигенности.

Материалы и методы

В работе использованы две группы штаммов. Первая была представлена 553 полногеномными сиквенсами штаммов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп, полученных из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Секвенирование проведено в ходе выполнения стратегической инициативы социально-

экономического развития Российской Федерации до 2030 года «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)». Выборка была представлена 449 и 18 штаммами серогрупп O1 и O139, а также 86 штаммами nonO1/nonO139 серогруппы соответственно. Необходимая информация о свойствах культур, месте и сроках их выделения получена из паспортов штаммов.

Вторая выборка была представлена 167 штаммами *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*-, выделенными из поверхностных водоемов в ходе мониторинга холеры в г. Ростове-на-Дону в 2022 году. Для выявления генов *csH1* и *arsB* в ПЦР использовали авторские праймеры *csH1* (прямой ACAGGTTCCGGTTAAGTGGTTT и обратный TTCACAGCCTGTAGACCCTT) [3], *arsB* (прямой ATGGGGATCCCTTACGACCA и обратный TACGCTTCATTCGCAAAGCG). Положительный результат реакции проявлялся в формировании целевого фрагмента массой 182 и 193 п.о. соответственно. Методики выделения ДНК и проведения ПЦР описаны ранее [3].

Библиотеку фрагментов ДНК готовили с использованием набора реагентов Illumina Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Ампликоны метили с использованием Nextera XT Index Kit (Illumina, США). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit. Сборка геномов осуществлялась программой Spades v. 3.15.4 [10]. Поиск генов проводился авторскими программами SeqAnalyzer и Fragment Extractor, написанными на языке Java [2].

Статистическую обработку полученных материалов осуществляли с использованием методов Libre Office Calc. Определение критерия согласия Пирсона χ^2 -квадрат и изучение линейной корреляции для произвольных таблиц проводили на онлайн-калькуляторе <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html>.

Результаты и обсуждение

Рабочим алгоритмом исследования было предположение, что гены, обуславливающие персистенцию вибрионов за счет резистентности к тяжелым металлам, локализованы в пределах одного генетического элемента [22, 24]. В качестве гена персистенции при низких температурах мы рассматривали обнаруженный нами ранее в полном геноме штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 20000 ген холодового шока *csH1* [1].

Первоначально при проверке этого предположения в составе нуклеотидной последовательности штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 20000 нами в ходе биоинформационного анализа был идентифицирован ген *arsB* размером 1065 нуклеотидов, кодирующий белок ACR3 (ACR3 family arsenite efflux transporter), состоящий из 354 аминокислот, который детерминирует устойчивость к токсическому действию мышьяка [21]. Основной биохимический механизм устойчивости бактерий к мышьяку — это энергозависимый выход арсенатов из клеточной цитоплазмы. Продукт гена *arsB* — антипортер, обеспечивающий выживание клетки за счет энергозависимого оттока токсичных арсенатов из клеток [11].

В базе данных GenBank на момент проведения исследования обнаружена информация о восьми полных геномах *V. cholerae*, несущих гены *csh1* и *arsB* (табл. 1).

Таблица 1

Локализация генов *csh1* и *arsB* на хромосомах штаммов *V. cholerae* различных серогрупп по данным анализа полногеномных последовательностей, представленных в NCBI GenBank in silico

| Номер штамма | Хромосомы | Расстояние между генами <i>csh1</i> и <i>arsB</i> в хромосоме, п.о. |
|--------------|-----------|---|
| CP012997.1 | 1 | 4205 |
| CP013013.1 | 1 | 4205 |
| AP024968.1 | 2 | 4203 |
| CP042300.1 | 2 | 4205 |
| CP036500.1 | 2 | 4267 |
| CP104355.1 | 2 | 629795 |
| CP104357.1 | 2 | 629795 |
| CP053807.1 | 2 | 708737 |

По результатам биоинформационного анализа было установлено, что гены *csh1* и *arsB* всегда располагались на одной хромосоме (в двух случаях в составе первой и в шести — в составе второй). В трех геномах гены *csh1* и *arsB* локализовались на значительном удалении (629795–708737 нуклеотидов), в то время как в пяти геномах их разделяло от 4203–4267 нуклеотидов (см. табл. 1). Данный результат мог свидетельствовать о возможном нахождении генов *csh1* и *arsB* у части штаммов в составе одного генетического элемента.

При анализе 553 секвенированных нуклеотидных последовательностей вибрионов O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп выявлена одинаковая закономерность для всех представителей: ген *arsB* обнаружен у *ctxAB*-штаммов, при его почти полном отсутствии у

ctxAB+ вариантов O1, O139 и nonO1/nonO139 (табл. 2). Интересно отметить, что подобную закономерность — отсутствие искомого гена у *ctxAB*+ вариантов — ранее обнаружили и для гена холодового шока *csh1* [1]. Проведенный ретроспективный анализ встречаемости *arsB*+ штаммов в выборке секвенированных геномов *V. cholerae* O1 не выявил существенных различий между наличием *arsB* и временем изоляции культур — процент *arsB*+ у штаммов, выделенных в период до 2000 года, составил 55,7%, а после 2000 года — 61,8%.

Таблица 2

Встречаемость гена *arsB* в секвенированных геномах штаммов *V. cholerae*

| Серогруппы штаммов <i>Vibrio cholerae</i> | Наличие (+)/отсутствие (-) гена холерного токсина <i>ctxAB</i> | Количество генотипов <i>ctxAB</i> + <i>ctxAB</i> - | Количество генотипов <i>arsB</i> + | Удельный вес <i>arsB</i> + генотипов, % |
|---|--|---|------------------------------------|---|
| O1 | + | 218 | 1 | >1 |
| | - | 231 | 139 | 60,1 |
| O139 | + | 11 | 0 | 0 |
| | - | 7 | 7 | 100 |
| nonO1/ nonO139 | + | 17 | 0 | 0 |
| | - | 69 | 35 | 50,7 |

Так как по результатам биоинформационного анализа ген устойчивости к мышьяку *arsB* отсутствовал у токсигенных штаммов, дальнейшие исследования по изучению сочетанной встречаемости генов проводились на выборке нетоксигенных вариантов. При этом у всех штаммов *V. cholerae* O139 *ctxAB*- содержался ген *arsB*. На наш взгляд, выборка секвенированных геномов данной серогруппы была недостаточно репрезентативна, проведение подобного исследования возможно на большей коллекции геномов.

При изучении сочетанной встречаемости гена холодового шока *csh1* и гена устойчивости к мышьяку *arsB* в секвенированных геномах штаммов *V. cholerae* O1 *ctxAB*- было найдено, что из 231 секвенированного генома оба гена присутствовали в 41,1% случаев, 19,0% геномов характеризовались отсутствием гена холодового шока при наличии гена устойчивости к мышьяку. Менее 1,0% геномов характеризовались наличием гена холодового шока и отсутствием гена устойчивости к мышьяку и 38,5% геномов не имели данные гены в своем составе (табл. 3).

Таблица 3

Сочетанная встречаемость генов *csh1* и *arsB* в секвенированных геномах *V. cholerae* O1 *ctxAB*-

| Генотип штамма | | Количество штаммов | Удельный вес в % |
|----------------|---------------|--------------------|------------------|
| <i>csh1</i> + | <i>arsB</i> + | 95 | 41,1 |
| <i>csh1</i> - | <i>arsB</i> - | 89 | 38,5 |
| <i>csh1</i> + | <i>arsB</i> - | 3 | >1 |
| <i>csh1</i> - | <i>arsB</i> + | 44 | 19,0 |
| Сумма | | 231 | 100 |

При изучении сочетанной встречаемости в секвенированных геномах *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*- выяснено, что из 69 геномов оба гена присутствовали в 23,2% случаев, 27,5% геномов характеризовались отсутствием гена холодового шока при наличии гена устойчивости к мышьяку. Менее 1,0% геномов характеризовалось наличием гена холодового шока и отсутствием гена устойчивости к мышьяку и 42,0% геномов не имели данные гены в своем составе (табл. 4).

Таблица 4

Сочетанная встречаемость генов *csh1* и *arsB* в секвенированных геномах музейных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*-

| Генотип штамма | | Количество штаммов | Удельный вес в % |
|----------------|---------------|--------------------|------------------|
| <i>csh1</i> + | <i>arsB</i> + | 16 | 23,2 |
| <i>csh1</i> - | <i>arsB</i> - | 29 | 42,0 |
| <i>csh1</i> + | <i>arsB</i> - | 5 | >1 |
| <i>csh1</i> - | <i>arsB</i> + | 19 | 27,5 |
| Сумма | | 69 | 100 |

Для анализа сочетанной встречаемости генов холодового шока *csh1* и устойчивости к мышьяку *arsB* также использовалась другая выборка культур — коллекция из 167 штаммов nonO1/nonO139, выделенных из водных объектов города Ростова-на-Дону в ходе мониторинга холеры в 2022 году. Наличие генов определяли в ПЦР с помощью специфических праймеров к генам *csh1* и *arsB*. По результатам, представленным в таблице 5, 124 штамма содержали ген холодового шока *csh1*, из них у 113 содержался также ген *arsB*; у 130 имелся ген устойчивости к мышьяку *arsB*, из них 124 имели также ген холодового шока *csh1*.

Таблица 5

Сочетанная встречаемость генов *csh1* и *arsB* у *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*- по данным ПЦР-анализа

| Генотип штамма | | Количество штаммов | Удельный вес в % |
|----------------|---------------|--------------------|------------------|
| <i>csh1</i> + | <i>arsB</i> + | 113 | 67,7 |
| <i>csh1</i> - | <i>arsB</i> - | 26 | 15,5 |
| <i>csh1</i> + | <i>arsB</i> - | 11 | 6,6 |
| <i>csh1</i> - | <i>arsB</i> + | 17 | 10,1 |
| Сумма | | 167 | 100 |

При статистической обработке полученных результатов изучения встречаемости генов *csh1* и *arsB* в секвенированных геномах *V. cholerae* O1 *ctxAB*- (см. табл. 3) вычислялся критерий согласия Пирсона по формуле:

$$\chi^2 = \sum \frac{(n_i - n'_i)^2}{n'}$$

где n_i — эмпирические частоты, полученные из выборки, n'_i — теоретические частоты, найденные теоретическим путём. Также вычислялся коэффициент сопряженности

$$\Phi = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}}$$

где χ^2 — критерий согласия Пирсона, n — общее количество наблюдений. Полученное значение $\chi^2 = 96,00$ при $\Phi = 0,64$ свидетельствовало о сильной связи и сочетанности двух исследуемых признаков — генов *csh1* и *arsB*.

При вычислении χ^2 и Φ для секвенированных геномов штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*- получены значение $\chi^2 = 7,83$ и $\Phi = 0,34$, что говорит о несильной связи и сочетанности двух исследуемых генов. Тем не менее для второй выборки, штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*-, выделенных из водных объектов города Ростова-на-Дону в ходе мониторинга холеры в 2022 году (см. табл. 4), критерий согласия Пирсона $\chi^2 = 49,28$ при $\Phi = 0,54$ свидетельствовал о наличии статистически достоверной связи и сочетанности у вибрионов генов *csh1* и *arsB*.

Анализ выявленных на двух выборках генотипов у *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* nonO1/nonO139 может говорить в пользу существования у части штаммов сопряженности генов *csh1* и *arsB*. В пользу этого предположения свидетельствуют данные анализа полных геномов, когда у пяти штаммов *V. cholerae* O1 расстояние между указанными генами составляло 4200–5500 нуклеотидов (см. табл. 1). При этом у трех штаммов

эта межгенная дистанция варьировала от 630000 до 700000 нуклеотидов, что доказывало автономное существование искомым генов у штаммов из данной выборки. Подобную закономерность сопряженности генов *csh1* и *arsB*, проанализировав в ПЦР, выявили и при анализе секвенированных геномов штаммов *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных из водных объектов города Ростова-на-Дону в ходе мониторинга холеры в 2022 году (см. табл. 5).

Полученные на выборке штаммов *V. cholerae* результаты в отношении выявления гена устойчивости к мышьяку соотносятся и дополняют имеющиеся литературные сведения. Так, актуальность этого направления исследования подчеркивают проблемы, связанные с присутствием высоких уровней мышьяка в водных объектах на эндемичных по холере территориях [20, 23]. Кроме того, в экспериментах по сравнительному определению устойчивости к токсическому действию мышьяка холерных вибрионов и других кишечных патогенов (*Salmonella enterica*, *Citrobacter rodentium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, энтерогеморрагической *E. coli* (EHEC) и *Shigella flexneri*) было установлено, что у *V. cholerae* резистентность к As превосходила таковую других видов в 5–500 раз. Высокий уровень устойчивости вибрионов к арсенатам реализовался альтернативным путем через активность As-индуцируемого оперона VC1068-1071, кодирующего арсенатный репрессор ArsR, альтернативную глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, предполагаемую фосфатазу и переносчик ArsJ [12]. Эти данные, устанавливающие существование у вибрионов альтернативной конститутивной системы защиты от токсического действия арсенатов, могут указывать на многофункциональность гена *arsB*.

Заключение

Таким образом, у *ctxAB*-штаммов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 обнаружен ген *arsB*, детерминирующий устойчивость к бактерицидному действию мышьяка. Установлена статистически достоверная сочетанная встречаемость у секвенированных штаммов *V. cholerae* O1 *ctxAB*- и *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*-, проанализированных в ПЦР, генов холодового шока *csh1* и гена устойчивости к мышьяку *arsB*. Найденная закономерность может отражать биологическую целесообразность синергизма указанных генов для выживания во внешней среде. Высказано предположение, что эти гены, обуславливающие персистенцию вибрионов за счет резистентности к тяжелым металлам и выживаемо-

сти в условиях холодового стресса, в ряде случаев могут быть локализованы в пределах одного генетического элемента. Тем не менее из-за практически полного отсутствия гена *arsB* у токсигенных штаммов и из-за малой изученной выборки штаммов O139 серогруппы, статистическую достоверность сопряженности генов у данных представителей доказать не представлялось возможным.

Литература

1. Бородина О.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Чемисова О.С., Полеева М.В. Изучение встречаемости гена холодового шока *csh1* у штаммов *Vibrio cholerae*, циркулирующих на территории Российской Федерации // Бактериология. — 2021. — Т. 6. — № 3. — С. 22–23.
2. Водопьянов А.С. SeqAnalyzer — программа для анализа результатов полногеномного секвенирования *Vibrio cholerae* // ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 2014. URL: <http://antiplague.ru/seqanalyzer/> (дата обращения: 11.05.2023).
3. Водопьянов С.О., Бородина О.В., Ежова М.И., Олейников И.П., Водопьянов А.С., Носков А.К. Ген холодового шока *csh1* у *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2022. — Т. 18. — № 4. — С. 12–19.
4. Кораблина И.В., Барабакин Т.О., Геворкян Ж.В., Евсеева А.И. Тяжелые металлы в органах и тканях промысловых рыб пресноводных объектов Северо-Кавказского региона // Труды ВНИРО. Среда обитания водных биологических ресурсов. — 2019. — Т. 177. — С. 151–166.
5. Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы nonO1/nonO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — № 2. — С. 14–23.
6. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — № 1. — С. 11–16.
7. Носков А.К., Кругликов В.В., Лопатин А.А., Чемисова О.С., Левченко Д.А., Иванова С.М., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Гаевская Н.Е., Подойницына О.А., Ежова М.И. Результаты мониторинга холеры на административных территориях России в период с 2013 по 2019 год // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2021. — № 2. — С. 163–175.
8. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2014. — Т. 69. — № 7–8. — С. 46–53.
9. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Водопьянов С.О., Москви-

- тина Э.А. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области в 2003–2014 гг. // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 2. – С. 39–41.
10. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J. Comput. Biol. – 2012. – Vol. 19(5). – P. 455–477.
 11. Ben Fekih I., Zhang Ch., Li Yu.P., Zhao Yi, Alwathnani H.A., Saquib Q., Rensing C., Cervantes C. Distribution of arsenic resistance genes in Prokaryotes // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – Art. 2473. doi: 10.3389/fmicb.2018.02473.
 12. Bueno E., Pinedo V., Shinde D.D., Mateus A., Typas A., Savitski M.M., Thomas V.C., Cava F. Transient glycolytic complexation of arsenate enhances resistance in the enteropathogen *Vibrio cholerae* // mBio. – 2022. – Vol. 13(5). – e01654-22. doi: 10.1128/mbio.01654-22.
 13. Costa W.F., Giambiagi-deMarval M., Laport M.S. Antibiotic and heavy metal susceptibility of non-cholera *Vibrio* isolated from marine sponges and sea urchins: Could they pose a potential risk to public health? // Antibiotics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2021. – Vol. 10(12). – Art. 1561. doi: 10.3390/antibiotics10121561.
 14. Fang J., Cheng H., Yu T., Jiang H. Occurrence of virulence factors and antibiotic and heavy metal resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Pacific mackerel at markets in Zhejiang, China // Journal of Food Protection. – 2020. – Vol. 83(8). – P. 1411–1419.
 15. Fu H., Yu P., Liang W., Kan B., Peng Xu, Chen L. Virulence, resistance, and genomic fingerprint traits of *Vibrio cholerae* isolated from 12 species of aquatic products in Shanghai, China // Microb. Drug Resist. – 2020. – Vol. 26(12). – P. 1526–1539.
 16. Jiang H., Yu T., Yang Y., Yu Sh., Wu J., Lin R., Li Y., Fang J., Zhu Ch. Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance and sequence type diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Penaeus vannamei* at freshwater farms, seawater farms, and markets in Zhejiang province, China // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – Art. 1294. doi: 10.3389/fmicb.2020.01294.
 17. Jo S.B., Shin Ch. H., Shin Yu J., Kim P.H., Park J., Kim M., Park B., So J. Heavy metal and antibiotic co-resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish // Marine Pollution Bulletin. – 2020. – Vol. 156. – Art. 111246. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111246.
 18. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood James L.N., Clemens J.D., Czerkinsky C., Balakrishna G.N., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic // Nature. – 2011. – Vol. 477(7365). – P. 462–465.
 19. Pavón A., Riquelme D., Jaña V., Iribarren C., Manzano C., Lopez-Joven C., Reyes-Cerpa S., Navarrete P., Pavez L., García K. The high risk of bivalve farming in coastal areas with heavy metal pollution and antibiotic-resistant bacteria: A Chilean perspective // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2022. – Vol. 12. – Art. 867446. doi: 10.3389/fcimb.2022.867446.
 20. Raessler M. The arsenic contamination of drinking and groundwaters in Bangladesh: Featuring biogeochemical aspects and implications on public health // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2018. – Vol. 75(1). – P. 1–7. doi: 10.1007/s00244-018-0511-4.
 21. Romero A.M., Maciaszczyk-Dziubinska E., Mombeinipour M., Lorentzon E., Aspholm E., Wysocki R., Tamás M.J. Etp1 confers arsenite resistance by affecting ACR3 expression // FEMS Yeast Res. – 2022. – Vol. 22(1). – Art. foac018. doi: 10.1093/femsyr/foac018.
 22. Ryan M.P., Slattery S., Pembroke J.T. A novel arsenate-resistant determinant associated with ICE_pMERPH, a member of the SXT/R391 group of mobile genetic elements // Genes. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. – 2019. – Vol. 10(12). – Art. 1048. doi: 10.3390/genes10121048.
 23. Sandhi A., Yu Ch., Rahman Md.M., Nurul Md.A. Arsenic in the water and agricultural crop production system: Bangladesh perspectives // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2022. – Vol. 29(34). – P. 51354–51366.
 24. Song Y., Yu P., Li B., Pan Y., Zhang X., Cong J., Zhao Y., Wang H., Chen L. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River estuary, China // BMC Microbiology. – 2013. – Vol. 13(1). – Art. 214. doi: 10.1186/1471-2180-13-214.
 25. Xu M., Wu J., Chen L. Virulence, antimicrobial and heavy metal tolerance, and genetic diversity of *Vibrio cholerae* recovered from commonly consumed freshwater fish // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2019. – Vol. 26(26). – P. 27338–27352.

References

1. Borodina OV, Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Oleynikov IP, Chemisova OS, Poleyeva MV. Izucheniye vstrechayemosti gena kholodovogo shoka *csh1* u shtammov *Vibrio cholerae*, tsirkuliruyushchikh na territorii Rossiyskoy Federatsii. Bakteriologiya 2021; 6(3):22–23 (in Russian).
2. Vodop'yanov AS. SeqAnalyzer – programma dlya analiza rezul'tatov polnogenomnogo sekvenirovaniya *Vibrio cholerae*. FKUZ Rostovskiy-na-Donu protivochumnyy institut

- Rospotrebnadzora, 2014. URL: <http://antiplague.ru/seqanalyzer/> (data obrashcheniya: 11.05.2023) (in Russian).
3. Vodop'yanov SO, Borodina OV, Yezhova MI, Oleynikov IP, Vodop'yanov AS, Noskov AK. Gen kholodovogo shoka ssh1 u *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2022; 18(4):12–19 (in Russian).
 4. Korablina IV, Barabashin TO, Gevorkyan ZHV, Yevseyeva AI. Tyazholye metally v organakh i tkanyakh promyslovykh ryb presnovodnykh ob'yektov Severo-Kavkazskogo regiona. Trudy VNIRO. Sreda obitaniya vodnykh biologicheskikh resursov 2019; 177:151–166 (in Russian).
 5. Monakhova YeV, Arkhangel'skaya IV. Kholernyye vibriony nonO1/nonO139 serogrupp v etiologii ostrykh kishchnykh infektsiy: sovremennaya situatsiya v Rossii i v mire. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2016; 2:14–23 (in Russian).
 6. Moskvitina EA, Mazrukho AB, Adamenko OL, Kruglikov VD. Kholera v nachale XXI veka. Prognoz na global'nom urovne. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2012; 1:11–16 (in Russian).
 7. Noskov AK, Kruglikov VV, Lopatin AA, Chemisova OS, Levchenko DA, Ivanova SM, Monakhova YeV, Arkhangel'skaya IV, Vodop'yanov AS, Gayevskaya NYe, Podoynitsyna OA, Yezhova MI. Rezul'taty monitoringa kholery na administrativnykh territoriyakh Rossii v period s 2013 po 2019 god. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2021; 2:163–175 (in Russian).
 8. Smirnova NI, Agafonov DA, Kul'shan' TA, Krasnov YAM, Kutyrev VV. Mikroevolyutsiya vzbuditelya kholery v sovremennyy period. Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk 2014; 69(7–8):46–53 (in Russian).
 9. Titova SV, Kruglikov VD, Yezhova MI, Vodop'yanov AS, Arkhangel'skaya IV, Vodop'yanov SO, Moskvitina EA. Analiz dinamiki vydeleniya i biologicheskikh svoystv shtammov *V. cholerae* O1 El Tor, izolirovannykh iz vodnykh ob'yektov na territorii Rostovskoy oblasti v 2003–2014 gg. Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya 2015; 2:39–41 (in Russian).
 10. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol 2012; 19(5):455–477.
 11. Ben Fekih I, Zhang Ch, Li YuP, Zhao Yi, Alwathnani HA, Saqib Q, Rensing C, Cervantes C. Distribution of arsenic resistance genes in Prokaryotes. Frontiers in Microbiology 2018; 9:2473. doi: 10.3389/fmicb.2018.02473.
 12. Bueno E, Pinedo V, Shinde DD, Mateus A, Typas A, Savitski MM, Thomas VC, Cava F. Transient glycolytic complexation of arsenate enhances resistance in the enteropathogen *Vibrio cholerae*. mBio 2022; 13(5):e01654-22. doi: 10.1128/mbio.01654-22.
 13. Costa WF, Giambiagi-deMarval M, Laport MS. Antibiotic and heavy metal susceptibility of non-cholera *Vibrio* isolated from marine sponges and sea urchins: Could they pose a potential risk to public health? Antibiotics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute 2021; 10(12):1561. doi: 10.3390/antibiotics10121561.
 14. Fang J, Cheng H, Yu T, Jiang H. Occurrence of virulence factors and antibiotic and heavy metal resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Pacific mackerel at markets in Zhejiang, China. Journal of Food Protection 2020; 83(8):1411–1419.
 15. Fu H, Yu P, Liang W, Kan B, Peng Xu, Chen L. Virulence, resistance, and genomic fingerprint traits of *Vibrio cholerae* isolated from 12 species of aquatic products in Shanghai, China. Microb Drug Resist 2020; 26(12):1526–1539.
 16. Jiang H, Yu T, Yang Y, Yu Sh, Wu J, Lin R, Li Y, Fang J, Zhu Ch. Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance and sequence type diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Penaeus vannamei* at freshwater farms, seawater farms, and markets in Zhejiang province, China. Frontiers in Microbiology 2020; 11:1294. doi: 10.3389/fmicb.2020.01294.
 17. Jo SB, Shin Ch H, Shin Yu J, Kim PH, Park J, Kim M, Park B, So J. Heavy metal and antibiotic co-resistance in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shellfish. Marine Pollution Bulletin 2020; 156:111246. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111246.
 18. Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, Connor TR, Lee JH, Kariuki S, Croucher NJ, Choi SY, Harris SR, Lebens M, Niyogi SK, Kim EJ, Ramamurthy T, Chun J, Wood James LN, Clemens JD, Czerkinsky C, Balakrish GN, Holmgren J, Parkhill J, Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. Nature 2011; 477(7365):462–465.
 19. Pavón A, Riquelme D, Jaña V, Iribarren C, Manzano C, Lopez-Joven C, Reyes-Cerpa S, Navarrete P, Pavez L, García K. The high risk of bivalve farming in coastal areas with heavy metal pollution and antibiotic-resistant bacteria: A Chilean perspective. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2022; 12:867446. doi: 10.3389/fcimb.2022.867446.
 20. Raessler M. The arsenic contamination of drinking and groundwaters in Bangladesh: Featuring biogeochemical aspects and implications on public health. Arch Environ Contam Toxicol 2018; 75(1):1–7. doi: 10.1007/s00244-018-0511-4.
 21. Romero AM, Maciaszczyk-Dziubinska E, Mombeinipour M, Lorentzon E, Aspholm E, Wysocki R, Tamás MJ. Etp1 confers arsenite resistance by affecting ACR3 expression. FEMS Yeast Res 2022; 22(1):foac018. doi: 10.1093/femsyr/foac018.
 22. Ryan MP, Slattery S, Pembroke JT. A novel arsenate-resistant determinant associated with ICE_pMERPH, a member of the SXT/R391 group of mobile genetic elements. Genes. Multidisciplinary Digital Publishing Institute 2019; 10(12):1048. doi: 10.3390/genes10121048.
 23. Sandhi A, Yu Ch, Rahman MdM, Nurul MdA. Arsenic in the water and agricultural crop production system: Bangladesh

- perspectives. *Environ Sci Pollut Res* 2022; 29(34):51354–51366.
24. Song Y, Yu P, Li B, Pan Y, Zhang X, Cong J, Zhao Y, Wang H, Chen L. The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River estuary, China. *BMC Microbiology* 2013; 13(1):214. doi: 10.1186/1471-2180-13-214.
25. Xu M, Wu J, Chen L. Virulence, antimicrobial and heavy metal tolerance, and genetic diversity of *Vibrio cholerae* recovered from commonly consumed freshwater fish. *Environ Sci Pollut Res* 2019; 26(26):27338–27352.

COMBINED OCCURRENCE OF COLD-SHOCK GENE *CSH1* AND ARSENICAL RESISTANCE GENE *ARSB* IN *VIBRIO CHOLERAE* O1, O139, NONO1/NONO139 SEROGROUPS

S.O. VODOPYANOV¹, A.A. GERASIMENKO¹, M.I. EZHOVA¹, A.V. EVTEEV¹,
A.S. VODOPYANOV¹, A.M. GOROKH¹, I.P. OLEJNIKOV¹, R.V. PISANOV¹,
V.D. KRUGLIKOV¹, A.R. KVASOV²

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

²Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don

The aim of the study was to identify potential genetic determinants of arsenic resistance and to determine the correlation between their presence and the presence of the cold-shock gene in the genomes of *V. cholerae* strains of various serogroups and toxigenicity. We used methods of genome-wide sequencing using bioinformatic analysis by the author's programs, as well as PCR analysis with statistical processing of the results obtained in each case. During the bioinformatic analysis of 553 whole genome sequences of *V. cholerae* O1, O139 and nonO1/nonO139 strains, as well as 167 *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctxAB*-strains in PCR, isolated from surface reservoirs during cholera monitoring in Rostov-on-Don in 2022, in nontoxigenic *V. cholerae* O1, O139 and nonO1/nonO139 serogroups the *arsB* gene encoding the ACR3 protein that determines resistance to the toxic effects of arsenic has been identified. A statistically significant relationship was established by the Pearson agreement criterion between the occurrence of the *arsB* gene and the *csH1* cold-shock gene for sequenced *V. cholerae* O1 and nonO1/nonO139 strains, isolated from surface reservoirs of Rostov-on-Don and analyzed in PCR. The absence of the *arsB* gene was shown in the studied *ctxAB*+ *V. cholerae* strains O1, O139 and nonO1/nonO139. It is assumed that the combination of arsenic resistance gene *arsB* and cold-shock gene *csH1* contributes to the persistence of *V. cholerae* strains in the external environment.

Keywords: *Vibrio cholerae*, toxigenic strains, non-toxigenic strains, cold-shock, *csH1* gene, tolerance to arsenate, *arsB* gene.

Address:

Gerasimenko A.A.

Junior researcher, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute
of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

E-mail: gerasimenko_aa@antiplague.ru

Для цитирования:

Водопьянов С.О., Герасименко А.А., Ежова М.И., Евтеев А.В., Водопьянов А.С., Горех А.М., Олейников И.П., Писанов Р.В., Кругликов В.Д., Квасов А.Р. Сочетанная встречаемость гена холодового шока *csH1* и гена устойчивости к мышьяку *arsB* у *Vibrio cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 серогрупп. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3):14–21.

For citation:

Vodopyanov S.O., Gerasimenko A.A., Ezhova M.I., Evteev A.V., Vodopyanov A.S., Gorokh A.M., Oleynikov I.P., Pisanov R.V., Kruglikov V.D., Kvasov A.R. Combined occurrence of cold-shock gene *csH1* and arsenical resistance gene *arsB* in *Vibrio cholerae* O1, O139, nonO1/nonO139 serogroups. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3):14–21 (in Russian).

ВОЗМОЖНОСТЬ СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО БАЦИЛЛЯРНОГО БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА С ДРУГИМИ МИКРОБНЫМИ ПЕСТИЦИДАМИ

А.В. МАЛКОВА*, А.Н. ИРКИТОВА, Д.Е.ДУДНИК, Е.Н. КАРГАШИЛОВА

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул

В настоящее время биопрепараты все чаще используются в сельском хозяйстве, в том числе в мероприятиях по интегрированной защите растений. В настоящем исследовании была изучена возможность совместного использования нового бациллярного биопрепарата для растениеводства с другими микробными пестицидами. Для этого использовались такие методы установления биосовместимости микроорганизмов, как метод перпендикулярных и параллельных штрихов. Было выявлено, что новый бактериальный препарат на основе трех штаммов *Bacillus pumilus* можно применять совместно с биопрепаратами «Триходерма вериде», «Алирин-Б» и «Лепидоцид». Равным образом такая процедура может осуществляться с фунгицидом «Фитоспорин М» при соблюдении очередности обработки растений биопрепаратами.

Ключевые слова: биопрепараты, *Bacillus*, биосовместимость, антагонизм, *Trichoderma*, *Metarhizium*.

Введение

Микробные биопрепараты нашли широкое применение в различных отраслях народного хозяйства, в том числе растениеводстве. Это во многом обусловлено их безопасностью для человека и животных, а также для окружающей среды в целом [7].

В зависимости от направленности применения микробные биопрепараты для растениеводства подразделяются на биоудобрения («Азофит», «Агробивит» и др.) и биопестициды («Фитоспорин-М», «Лепидоцид» и др.). Среди последних по объекту, на который направлено действие, отдельно выделяются инсектициды, акарициды, нематоциды, фунгициды и бактерициды, как и в случае с химическими препаратами [6, 8].

Биопрепараты на основе микроорганизмов чаще всего имеют бактериальную или грибную природу. Среди активных составляющих биологических средств для растениеводства особенно популярны микромицеты рода *Trichoderma* («Стернифаг», «Глиокладин» и др.), а также бактерии родов *Pseudomonas* («Планриз», «Бинорам» и др.) и *Bacillus* [1, 2, 4]. Выбор этих микроорганизмов не

случаен, ведь они являются активными антагонистами к фитопатогенам, способны продуцировать фитогормоны и другие БАВ [12, 14, 16].

Механизмы интегрированной защиты растений предполагают одновременное использование различных препаратов и методов, поскольку нет единственного верного и самодостаточного способа для решения сельскохозяйственных задач. Поэтому при разработке новых биопрепаратов важно учитывать не только эффективность действующих микроорганизмов, но и возможность совместного применения микробных препаратов с другими средствами для растений, в том числе биологическими [3].

Цель работы — оценить возможность совместного использования нового бациллярного биопрепарата для растениеводства с другими микробными пестицидами.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований выступал биопрепарат для растениеводства на основе трех штаммов *B. pumilus*, разработанный в ИЦ «Промбиотех» (Алтайский государственный университет) [15]. Его биосовместимость проверяли со штаммами из следующих биопрепаратов для растениеводства: инсектицидами «Лепидоцид» (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*), «Метаризин» (*Metarhizium anisopliae*) и фунгицидами «Алирин-Б» (*B. subtilis* В-10), «Фитоспорин М» (*B. subtilis* 26Д), «Экстрасол» (*B. subtilis* Ч-13), «Триходерма вериде» (*Tr.*

© 2023 г. Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н.

* Автор для переписки:

Малкова Ангелина Владимировна

аспирант кафедры экологии, биохимии и биотехнологии Института биологии и биотехнологии, младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета

E-mail: gelishka96@mail.ru

viride 471), «Трихоцин» (*Tr. harzianum* Г 30 ВИЗР) и «Глиокладин» (*Tr. harzianum* 18 ВИЗР).

При установлении типа взаимоотношений между бактериальными штаммами использовали метод перпендикулярных штрихов, культивирование осуществляли на L-среде [5]. В случае с микромицетами применяли метод параллельных штрихов и картофельно-сахарозный агар [11].

Учет результатов с техникой перпендикулярных штрихов проводили по отсутствию/наличию зон подавления роста. В случае выявления антагонистических взаимоотношений результат выражали через среднее со стандартным отклонением ($M \pm m$).

При использовании метода параллельных штрихов сравнивали диаметр и площадь колоний грибов в контрольных и опытных чашках. Также устанавливали показатель подавления роста (P):

$$P = \frac{Mk - Mo}{Mk} \times 100\%,$$

где Mk — площадь мицелия плесени в контроле;
 Mo — площадь мицелия плесени в опыте.

Результаты и обсуждение

Характер межмикробных взаимодействий в составе биологических препаратов определяет уровень их эффективности при промышленном применении в сельском хозяйстве. Как видно из таблицы 1, консорциум бацилл из нового биопрепарата однозначно был совместим со штаммами *B. subtilis* В-10 и *B. thuringiensis var. kurstaki*. Поэтому разработанное средство для защиты растений можно применять совместно с биопестицидами «Алирин-Б» и «Лепидоцид».

Таблица 1

Совместимость нового биопрепарата (БПР) с бациллами из других биопестицидов

| Штаммы по вертикали | Штаммы по горизонтали | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| | БПР | <i>B. subtilis</i> В-10 | <i>B. subtilis</i> 26Д | <i>B. subtilis</i> Ч-13 | <i>B. thuringiensis var. kurstaki</i> |
| БПР | | + | - (2,33±0,58) | - (21,67±2,08) | + |
| <i>B. subtilis</i> В-10 | + | не устанавливалось | | | |
| <i>B. subtilis</i> 26Д | + | | | | |
| <i>B. subtilis</i> Ч-13 | - (1,00±0,00) | | | | |
| <i>B. thuringiensis var. kurstaki</i> | + | | | | |

Примечание: «+» — биосовместимы, «-» — антагонизм ($M \pm m$ в мм)

Со штаммом *B. subtilis* 26Д композиция из трех штаммов *B. pumilus* была совместима только тогда, когда первым засеивался штамм из препарата «Фитоспорин М». В обратном же случае консорциум бацилл подавлял рост тест-культуры на 2,33 мм в среднем. Поэтому совместное применение данных препаратов возможно, но оно должно быть либо единовременным, либо в первую очередь необходимо осуществлять обработку биопестицидом «Фитоспорин М».

Штамм *B. subtilis* Ч-13 и консорциум бацилл из нового биопрепарата оказались обоюдно несовместимыми. Причем, бактерии из разработанного средства защиты растений в среднем подавляли рост штамма из препарата «Экстрасол» почти на 22 мм (рис. 1). Вероятно, это связано с тем, что в данном случае штаммы *B. pumilus* успели накопить в среде высокую концентрацию бактериоцинов, эффективных против близкого вида *B. subtilis* [10].



Рис. 1. Тест на биосовместимость разработанного биопрепарата со штаммом из «Экстрасола»: 1 — штрих со штаммами из разработанного биопрепарата; 2 — зона подавления роста; 3 — штрих со штаммом *B. subtilis* Ч-13

В соответствии с данными в таблице 2, штаммы *Tr. viride* 471 и *Tr. harzianum* Г 30 за 7 суток распространялись по всей чашке в контроле. Некоторые образцы *Tr. harzianum* 18 развивались до максимально возможной площади уже на 3-е сутки эксперимента.

Первоначально размеры колоний *M. anisopliae* в опыте и контроле (к 3 суткам) были фактически идентичными. Однако в ходе дальнейшего культивирования площадь, занимаемая грибом в чашках с бактериями из биопрепарата, оказалась меньше, чем в чистой культуре микромицета за это же время. К моменту окончания эксперимента степень подавления роста *M. anisopliae*

бактериями из разрабатываемого биопрепарата составила почти 61%. Поэтому новый пестицид не рекомендовано применять с препаратом «Метаризин», так как микроорганизмы из их составов несовместимы.

С представителями рода *Trichoderma* была зафиксирована отличная картина — в первой контрольной точке исследований уже отмечалось более слабое развитие грибов в опыте, чем в контроле. При этом четко прослеживалось преобладание роста мицелия в длину над ростом в ширину (рис. 2.). Вероятно, это связано с тем, что бактерии со штрихов выделяли в среду свои продукты метаболизма.

Таблица 2

**Совместимость консорциума бактерий из нового биопрепарата (БПР)
со штаммами грибов из других биопестицидов**

| Экспериментальные данные | | | | | | | |
|--------------------------------------|--------------------------|---|--|--------------|---|--------------|--------------|
| Штаммы грибов | Параметры колонии грибов | Размер колонии микромицетов (M±m, мм) в контрольных чашках, по суткам | | | Размер колоний микромицетов (M±m, мм) в опытных чашках, по суткам | | |
| | | 3 | 10 | 14 | 3 | 10 | 14 |
| <i>M. anisopliae</i> | Длина | 25,00±0,00 | 72,50±2,12 | 77,00±1,41 | 24,67±0,58 | 59,67±5,51 | 71,33±2,52 |
| | Ширина | 26,00±1,41 | 73,00±0,00 | 76,00±1,41 | 23,67±0,58 | 31,33±0,58 | 32,00±0,00 |
| <i>Tr. viride</i> 471 | Длина | 59,00±4,58 | на всю чашку | на всю чашку | 46,33±1,53 | на всю чашку | на всю чашку |
| | Ширина | 57,67±2,52 | | | 31,67±0,58 | | |
| <i>Tr. harzianum</i> Г 30 | Длина | 83,33±11,55 | на всю чашку | на всю чашку | 65,33±8,51 | 74,33±13,65 | 84,00±3,61 |
| | Ширина | 86,67±5,77 | | | 29,67±0,58 | 34,67±6,11 | 38,00±1,73 |
| <i>Tr. harzianum</i> 18 | Длина | 85,33±8,08 | на всю чашку | на всю чашку | 68,67±1,15 | 75,33±1,53 | 75,33±1,53 |
| | Ширина | 85,00±8,66 | | | 26,33±1,53 | 27,33±0,58 | 27,33±0,58 |
| Степень антагонистической активности | | | | | | | |
| Штаммы грибов | | Площадь мицелия грибов в контроле на 14-е сутки опыта (Mk), см ² | Площадь колонии грибов в опыте на 14-е сутки опыта (Mo), см ² | | Показатель подавления (P), % | | |
| <i>M. anisopliae</i> | | 45,94 | 17,92 | | 60,99 | | |
| <i>Tr. viride</i> 471 | | 78,50 | 78,50 | | 0 | | |
| <i>Tr. harzianum</i> Г 30 | | 78,50 | 25,10 | | 68,08 | | |
| <i>Tr. harzianum</i> 18 | | 78,50 | 16,16 | | 79,41 | | |

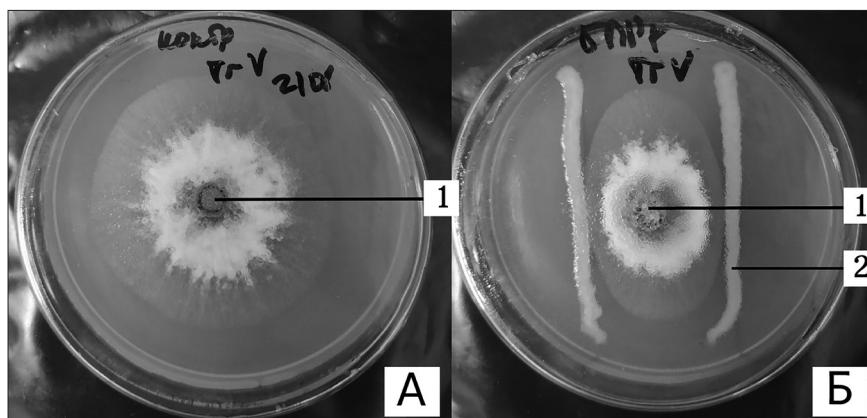


Рис. 2. Контрольная (А) и опытная (Б) чашки с культурой *Tr. viride* 471 на 3-и сутки эксперимента:
1 — культура микромицета; 2 — штрих со штаммами бактерий из разработанного биопрепарата

При дальнейшем культивировании для штамма *Tr. viride* 471 был зафиксирован равномерный рост мицелия по чашке, как в опыте, так и контроле. И к окончанию эксперимента степень подавления роста гриба составила 0%, поэтому штаммы из бактериального препарата и «Триходерма вериде» можно считать относительно биосовместимыми.

Рост других представителей рода *Trichoderma* к 14-м суткам исследования также был замедлен в опыте по сравнению с контролем, как и в начале эксперимента. Мицелий грибов в образцах с бактериями не распространился сплошным газоном к краям чашки, а лишь в виде одиночных колоний, что не было характерно для контрольных культур. Поэтому разработанный препарат нельзя применять совместно с фунгицидами «Трихоцин» и «Глиокладин».

Заключение

Таким образом, консорциум штаммов *B. pumilus* из нового биопрепарата оказался более совместимым с бактериальными штаммами, нежели грибными. Это может быть обусловлено высокой фунгицидной активностью данной микробной композиции, предположительно, из-за способности к продукции сурфактинов, хитиназы и др. [9, 13]. Разработанное средство для защиты растений можно применять совместно с такими биопестицидами, как «Триходерма вериде», «Алирин-Б» и «Лепидоцид», а также с фунгицидом «Фитоспорин М» при соблюдении очередности обработки растений биопрепаратами.

Работа выполнена при поддержке ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» в рамках реализации программы стратегического академического лидерства «Приоритет—2030», проект «Наработка биопрепаратов для сельского хозяйства».

Литература

1. Горбунов О.П. Совершенствование препаратов на основе *Pseudomonas aureofaciens* // Защита и карантин растений. — 2011. — № 5. — С. 35–36.
2. Джалилов Ф.С. Биологические препараты против болезней растений // Картофель и овощи. — 2018. — № 8. — С. 2–4.
3. Долженко В.И. Защита растений: настоящее и будущее // Плодородие. — 2018. — № 1. — С. 24–26.
4. Зиганшин Д.Д., Сироткин А.С. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба // Вестник Казанского технологического университета. — 2017. — Т. 20. — № 10. — С. 155–158.
5. Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е. Биосовместимость природных штаммов бактерий, перспективных для включения в состав микробного биопрепарата // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2022. — Т. 18. — № 1. — С. 38–43.
6. Минаева О.М., Акимова Е.Е., Зюбанова Т.И., Терещенко Н.Н. Биопрепараты для защиты растений: оценка качества и эффективности. — Томск: Издательский Дом Томского государственного университета. — 2018. — 130 с.
7. Нугманова Т.А. Использование биопрепаратов для растениеводства // Биология растений и садоводство: теория, инновации. — 2017. — Т. 144. — Ч. 1. — С. 211–214.
8. Рубанов Н.И., Фомин А.А. Рынок биопродуктов в растениеводстве // Московский экономический журнал. — 2018. — № 3. — С. 76–96.
9. Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Аллахвердян В.В. Особенности антагонизма бактерий рода *Bacillus* по отношению к токсигенным грибам *Fusarium* при защите растений от болезни и контаминации микотоксинами (обзор) // Юг России: экология, развитие. — 2021. — Т. 16. — № 4. — С. 86–103.
10. Тагиева С.А., Гахраманова Ф.Х. Преимущества применения бактериоцидных препаратов по сравнению с хими-

ческими антибиотиками для лечения инфекций у человека и животных // Вестник Воронежского государственного университета. — 2020. — № 4. — С. 122–128.

11. Чеботарь В.К., Ерофеев С.В., Щербачев А.В., Чижевская Е.П. Пат. 2551968, МПК51 С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus pumilus* A 1.5, в качестве средства повышения продуктивности растений и их защиты от болезней, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами, 2015.
12. Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // *Frontiers in Plant Science*. — 2018. — Vol. 9. — Art. 1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473.
13. Ghasemi S., Ahmadian G., Jelodar N.B., Rahimian H., Ghandili S., Dehestani A., Shariati P. Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. — 2010. — Vol. 26. — Is. 8. — P. 1437–1443.
14. Li Y., Sun R., Yu J., Saravanakumar K., Chen J. Antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the maize stalk rot pathogen *Fusarium graminearum* // *Indian Journal of Microbiology*. — 2016. — Vol. 56. — Is. 3. — P. 318–327.
15. Malkova A., Evdokimov I., Shirmanov M., Irkitova A., Dudnik D. Development of a microbiological preparation for crops based on *Bacillus pumilus* strains // *BIO Web Conf. International Scientific and Practical Conference «Fundamental Scientific Research and Their Applied Aspects in Biotechnology and Agriculture» (FSRAABA 2021)*. — 2021. — Vol. 36. — Art. 07012. doi: 10.1051/bioconf/20213607012.
16. Mazylyte R., Kaziuniene J., Orola L., Valkovska V., Lastauskiene E., Gegeckas A. Phosphate solubilizing microorganism *Bacillus* sp. MVY-004 and its significance for biomineral fertilizers' development in agrobiotechnology // *Biology*. — 2022. — Vol. 11. — Art. 254. doi: 10.3390/biology11020254.
- ya v sostav mikrobnogo biopreparata. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2022; 18(1):38–43 (in Russian).
6. Minayeva OM, Akimova YeYe, Zyubanova TI, Tereshchenko NN. Biopreparaty dlya zashchity rasteniy: otsenka kachestva i effektivnosti. Tomsk: Izdatel'skiy Dom Tomskogo gosudarstvennogo universiteta 2018: 130 (in Russian).
7. Nugmanova TA. Ispol'zovaniye biopreparatov dlya rasteniyevodstva. *Biologiya rasteniy i sadovodstvo: teoriya, innovatsii* 2017; 144(Pt. 1):211–214 (in Russian).
8. Rubanov NI, Fomin AA. Rynok bioproduktov v rasteniyevodstve. *Moskovskiy ekonomicheskij zhurnal* 2018; 3:76–96 (in Russian).
9. Sidorova TM, Asaturova AM, Allakhverdyan VV. Oso-bennosti antagonizma bakteriy roda *Bacillus* po otnosheniyu k toksinogennym gribam *Fusarium* pri zashchite rasteniy ot bolezni i kontaminatsii mikotoksinami (obzor). *Yug Rossii: ekologiya, razvitiye* 2021; 16(4): 86–103 (in Russian).
10. Tagiyeva SA, Gakhramanova FK. Preimushchestva prim-eneniya bakteriotsinnykh preparatov po sravneniyu s khimi-cheskimi antibiotikami dlya lecheniya infektsiy u cheloveka i zhivotnykh. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo univer-siteta* 2020; 4:122–128 (in Russian).
11. Chebotar' VK, Yerofeyev SV, Shcherbakov AV, Chizhevskaya YeP. Pat. 2551968, МПК51 С 12 N 1/20. Shtamm bakteriy *Bacillus pumilus* A 1.5, v kachestve sredstva povysheniya produktivnosti rasteniy i ikh zashchity ot bolezney, vyzyvayemykh fitopatogennymi mikroorganizmami, 2015 (in Russian).
12. Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Subramanian S, Smith DL. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science* 2018; 9:1473. doi: 10.3389/fpls.2018.01473.
13. Ghasemi S, Ahmadian G, Jelodar NB, Rahimian H, Ghandili S, Dehestani A, Shariati P. Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010; 26(8):1437–1443.
14. Li Y, Sun R, Yu J, Saravanakumar K, Chen J. Antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the maize stalk rot pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian Journal of Microbiology* 2016; 56(3):318–327.
15. Malkova A, Evdokimov I, Shirmanov M, Irkitova A, Dudnik D. Development of a microbiological preparation for crops based on *Bacillus pumilus* strains. *BIO Web Conf. International Scientific and Practical Conference «Fundamental Scientific Research and Their Applied Aspects in Biotechnology and Agriculture» (FSRAABA 2021)* 2021; 36:07012. doi: 10.1051/bioconf/20213607012.
16. Mazylyte R, Kaziuniene J, Orola L, Valkovska V, Lastauskiene E, Gegeckas A. Phosphate solubilizing microorganism *Bacillus* sp. MVY-004 and its significance for biomineral fertilizers' development in agrobiotechnology. *Biology* 2022; 11:254. doi: 10.3390/biology11020254.

References

1. Gorbunov OP. Sovershenstvovaniye preparatov na osnove *Pseudomonas aureofaciens*. *Zashchita i karantin rasteniy* 2011; 5:35–36 (in Russian).
2. Dzhililov FS. Biologicheskiye preparaty protiv bolezney rasteniy. *Kartofel' i ovoshchi* 2018; 8:2–4 (in Russian).
3. Dolzhenko VI. Zashchita rasteniy: nastoyashcheye i budushcheye. *Plodorodiye* 2018; 1:24–26 (in Russian).
4. Ziganshin DD, Sirotkin AS. Osobennosti glubinnogo i poverkhnostnogo kul'tivirovaniya gribov *Trichoderma* dlya polucheniya biopreparatov na osnove kletok griba. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* 2017; 20(10):155–158 (in Russian).
5. Malkova AV, Irkitova AN, Dudnik DYe. Biosovmestimost' prirodnnykh shtammov batsill, perspektivnykh dlya vklucheni-

POSSIBILITY OF COMBINED USE OF A NEW BACILLARY BIOPREPARATION FOR CROP PRODUCTION WITH OTHER MICROBIAL PESTICIDES

A.V. MALKOVA, A.N. IRKITOVA, D.E. DUDNIK, E.N. KARGASHILOVA

Altai State University, Barnaul

Currently, biopreparations are widely used in agriculture, including in integrated plant protection measures. In this study the possibility of co-using a new bacillary biopreparation for crop production with other microbial pesticides was studied. For this purpose such methods of establishing the biocompatibility of microorganisms were used as perpendicular and parallel bands method. It was found that a new bacterial preparation based on 3 *Bacillus pumilus* strains can be used in conjunction with the biopreparations «*Trichoderma viride*», «Alirin-B» and «Lepidocid». Similarly, such a procedure can be carried out with the fungicide «Fitosporin M» subject to the order of treatment of plants with biological products.

Keywords: biopreparations, *Bacillus*, biocompatibility, antagonism, *Trichoderma*, *Metarhizium*.

Address:

Malkova A.V.

Post-graduate student of the Department of Ecology, Biochemistry and Biotechnology of the Institute of Biology and Biotechnology, Junior Researcher of the EC «Prombiotech», Altai State University
E-mail: gelishka96@mail.ru

Для цитирования:

Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н. Возможность совместного использования нового бактериального биопрепарата для растениеводства с другими микробными пестицидами. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3):22–27.

For citation:

Malkova A.V., Irkitova A.N., Dudnik D.E., Kargashilova E.N. Possibility of combined use of a new bacillary biopreparation for crop production with other microbial pesticides. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3):22–27 (in Russian).

СОЗДАНИЕ СОВМЕСТНЫХ КУЛЬТУР ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ МОРКОВИ С МИКОРИЗНЫМ ГРИБОМ *RHIZOPHAGUS IRREGULARIS*

Я.П. МИНЕЕВ^{1*}, М.В. КУЗНЕЦОВА², Х.Г. МУСИН¹, Б.Р. КУЛУЕВ¹

¹ Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук»,
² Научно-внедренческое предприятие «Башинком», Уфа

Гриб *Rhizophagus irregularis* широко применяется при создании биопрепаратов арбускулярной микоризы, однако его не удается культивировать в биотехнологических условиях без растения хозяина. Волосовидные корни, получаемые при помощи *Agrobacterium rhizogenes*, являются перспективной системой для совместного культивирования с грибами арбускулярной микоризы. Целью настоящего исследования было создание совместных культур гриба *R. irregularis* с волосовидными корнями моркови, а также оценка их темпов роста и микоризации. В результате проведенных работ были получены совместные культуры *R. irregularis* с волосовидными корнями моркови и осуществлен их микроскопический анализ на разных стадиях микоризации. По результатам морфометрического анализа отмечено замедление темпов роста волосовидных корней при взаимодействии с микоризой в первые две недели по сравнению со стерильными культурами волосовидных корней. Констатированы изменения в морфологии волосовидных корней при внесении высоких концентраций спор микоризного гриба в виде стимуляции образования каллуса, приводящего к нарушению покровных тканей в местах инокуляции. Полученные совместные культуры волосовидных корней моркови с *R. irregularis* могут быть использованы в фундаментальных исследованиях арбускулярной микоризы, а также предложены для получения микоризных биопрепаратов в биотехнологическом производстве.

Ключевые слова: арбускулярная микориза, волосовидные корни, совместное культивирование, *Daucus carota*, *Rhizophagus irregularis*.

Введение

Одним из способов повышения жизнеспособности и урожайности культурных растений является использование естественных биологических симбионтов — микоризных грибов. Микоризный симбиоз между корневой системой растений и грибами представляет собой наиболее широко распространенное и экологически значимое взаимодействие между разными организмами [11]. Среди симбиотических грибов арбускулярно-микоризные относятся к наиболее распространенной группе. Чаще всего в формировании арбускулярной микоризы участвуют грибы класса Glomeromycetes, которые служат облигатными симбионтами около 75% всех наземных растений [6, 8, 9]. Морфологическая особенность арбускулярной микоризы (АМ) заключается в проникновении гиф

гриба внутрь корня растения и образовании обменных, запасающих и регуляторных структур. В силу этой особенности такой тип симбиоза иногда называют эндомикоризой [5, 13]. В сельскохозяйственном производстве использование препаратов АМ позволяет значительно сократить количество вносимых удобрений. АМ оказывает воздействие на фитогормональную регуляцию растений, в первую очередь, связанную с гиббереллинами, ауксинами и цитокининами. Также имеются данные о положительном влиянии АМ на фотосинтетическую активность растений. Всё это говорит о комплексном воздействии на растение-хозяина, в результате чего происходит повышение его адаптивных и конкурентных свойств [3, 12].

Для АМ грибов формирование симбиоза с растением является генетически облигатной стадией жизненного цикла, без которой невозможно формирование новых спор, а также стабильного мицелия даже в условиях богатых питательных сред *in vitro*. Поэтому на сегодняшний день технология производства микоризных биопрепаратов предполагает использование растений-носителей в условиях открытого грунта, либо тепличных.

© 2023 г. Минеев Я.П., Кузнецова М.В., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р.

* Автор для переписки:

Минеев Яков Павлович

аспирант института биохимии и генетики УФИЦ РАН

E-mail: Laym2101@yandex.ru

Также предпринимаются попытки биотехнологических методов выращивания, например, с использованием волосовидных корней [7].

Волосовидные (ранее известные как бородачатые) корни (от англ. «hairу roots») могут послужить эффективной заменой растения-хозяина в жизненном цикле у арбускулярно-микоризных грибов. Волосовидные корни (ВК) можно встретить и в природе, их рост инициируется агробактериями *Agrobacterium rhizogenes* за счёт переноса онкогенов группы «root locus» (*rol*-гены) в составе Т-ДНК в геномы растений. Данная генная модификация растения агробактерией отличается высокой генетической стабильностью и может передаваться в последующие поколения [2]. Способность ВК к неограниченному росту на безгормональных питательных средах, а также наличие в них типичных корневых тканей и метаболитов представляются огромным преимуществом для использования в биотехнологических процессах.

Целью настоящего исследования было создание совместных культур гриба *R. irregularis* с волосовидными корнями моркови, а также оценка их темпов роста и микоризации [1].

Материалы и методы

В работе использовался штамм микоризного гриба *Rhizophagus irregularis* ВКПМ F-1572, выделенный из почвы цитрусовой плантации «Клермонт-Миннеола», Орlando, штат Флорида, США.

В качестве растения-хозяина использовались волосовидные корни, полученные ранее посредством агробактериальной трансформации моркови посевной *Daucus carota* (Hoffm.). Для генетической трансформации использовали *Agrobacterium rhizogenes* штамма А4. Совместные культуры ВК и гриба выращивали в пластиковых чашках Петри и стеклянных колбах на полной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС).

В ходе культивирования фиксировались показатели темпов роста культур ВК с инокулятом микоризы, содержащих споры и мицелий гриба *R. irregularis*. Исследовались временные рамки, необходимые для микоризации ВК моркови. Проводился анализ воздействия микоризы на ВК при разных дозировках спор микоризного гриба, применяемых в качестве инокулята. Использовались стандартные морфометрические подходы: проводилась оценка ростовых и морфометрических показателей волосовидных корней, частота появления новых ветвлений ВК, а также ми-

кроскопический анализ наружных и внутрикортексных проявлений микоризного гриба в виде гиф мицелия, везикуло-споровых формирований и арбускулярных аппаратов обмена. Микроскопическое исследование проводилось с помощью микроскопа микмед-6 (АО Ломо).

Для выявления способности и восприимчивости ВК к микоризе *R. irregularis* часть корня была инокулирована каплей раствора, содержащего споры гриба. В последующем отбирались образцы исследуемых фрагментов ВК по прошествии 3, 5, 7, 10 и 14 дней, так как две недели обозначают собой крайний срок для микоризации корней растений в природных условиях [10]. Образцы корней фиксировались и окрашивались метиловым синим и изучались под световым микроскопом для визуального подтверждения микоризации и особенностей взаимодействия гриба и корня.

После подтверждения способности волосовидных корней моркови к эффективному взаимодействию с микоризой *R. irregularis* проводилась оценка ростовых параметров ВК при наличии и отсутствии микоризы. Оценку осуществляли посредством измерения скорости роста ВК в длину, а также интенсивности активации апикальных центров боковых ветвлений.

Испытывались инокуляты с различной концентрацией спор для выявления наиболее эффективных микоризирующих ВК концентраций в жидкой питательной среде. Для этого колбы объёмом 100 мл заполняли питательной средой до 75 мл и одинаковым количеством фрагментов ВК. Далее в питательную среду добавляли 5 мл раствора, содержащего споры *R. irregularis* в количестве 100, 250, 500, 1000, 5000, 25000 спор на 1 мл. Последующее наблюдение проводили посредством микроскопии живых ВК. Анализировали состояние тканей ВК, проявления внешнего мицелия микоризного гриба, а также формирования микоризы внутри кортекса корней.

Результаты

При инокуляции волосовидных корней спорами микоризного гриба *R. irregularis* на твёрдой питательной среде МС незначительную стимуляцию темпов роста ВК начинали фиксировать на 2–3-й неделе культивации (рис. 1).

Изменений активности в образовании вторичных ветвей ВК с инициацией вторичных апикальных центров роста не наблюдалось в течение 6 недель культивации (рис. 2).

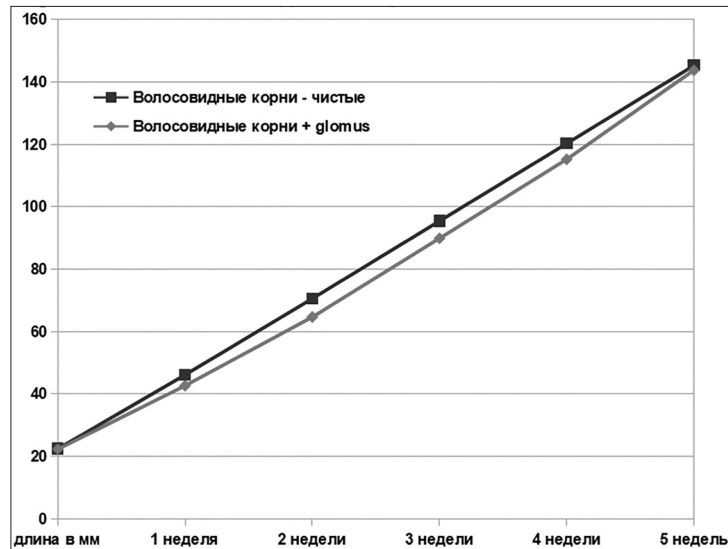


Рис. 1. График темпов роста волосовидных корней с микоризным грибом. По оси ординат представлено удлинение ВК в мм за 1 неделю

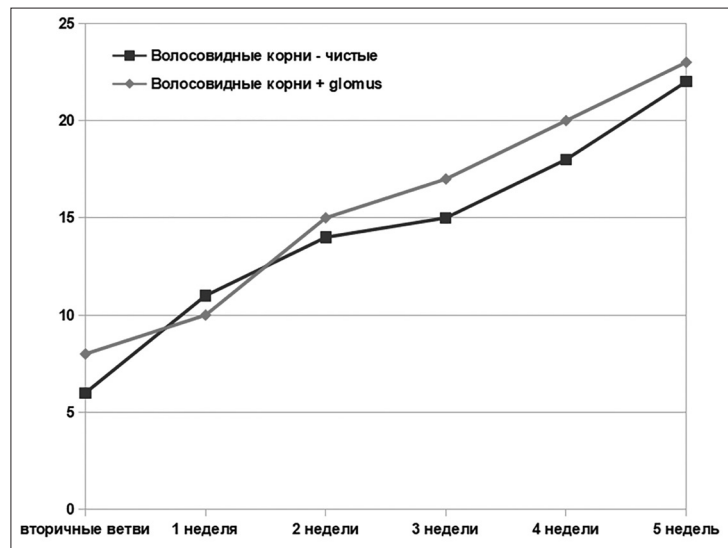


Рис. 2. График ветвления волосовидных корней в ходе совместной культивации с микоризным грибом (количество растущих ответвлений)

По результатам анализа культивации с равными по размеру эксплантами контрольной линии ВК и корней спустя 3 недели после инокуляции микоризой, контрольная линия ВК демонстрировала интенсивный рост с самого начала культивации. К 5-й неделе эксперимента рост чистых ВК превосходил в росте микоризированные корни на 10–15% (рис. 3). Микоризированные ВК демонстрировали замедленное развитие в течение первой и второй недели эксперимента после перенесения на новый субстрат, существенно ускорившись в росте, как уже было отмечено выше, начиная с 3-й недели культивации, однако так и не догнав по скорости роста контрольную линию ВК к концу эксперимента (см. рис. 3).

Колонизация волосовидных корней прошла эффективно как при инокуляции фрагментами спор, так и спорово-мицелиальными комплексами гриба *R. irregularis*. Проявление внешнего мицелия на большей части поверхности волосовидных корней, а также формирование в большей части корня внутрикорневых структур — арбускул и везикул, наблюдалось в промежутке от 10 до 15 дней после инокуляции микоризным грибом (см. рис. 3 а–г). В процессе наблюдения совместной культуры была обнаружена способность гриба к образованию защитной слизистой оболочки на поверхности ВК, которая проявлялась при подсыхании твердых питательных сред. Поэтому можно предположить, что она необходима для удержания влаги (рис.

4д). Эта слизистая оболочка закрывала большую часть поверхности волосовидного корня, но распределялась неравномерно. Для проверки предположения о защитной функции слизистой оболочки микоризного гриба в жидкую питательную среду были добавлены бактерии *Bacillus licheniformis*. После этого реакция образования слизистого чехла вокруг волосовидного корня повторилась с еще большей интенсивностью (рис. 4е). Оболочка присутствовала во время обычного культивирования как в жидкой, так и на твердой питательных средах. Однако в отсутствие заражения бактериями её слой был значительно меньше, и она была почти полностью прозрачной, проявляясь лишь небольшим преломлением света по контуру.

Рис. 3. Сравнение темпов роста стерильных волосовидных корней (а, б, в) с микоризованными волосовидными корнями (г, д, е) на агаризованной среде МС. а, г — спустя неделю после начала культивации, б, д — спустя 3 недели культивации, в, е — спустя 5 недель культивации

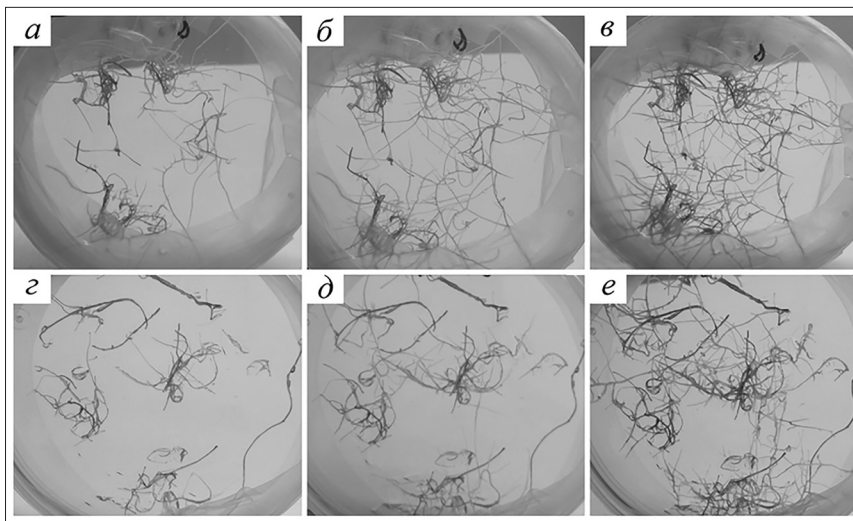


Рис. 3. Сравнение темпов роста стерильных волосовидных корней (а, б, в) с микоризованными волосовидными корнями (г, д, е) на агаризованной среде МС. а, г — спустя неделю после начала культивации, б, д — спустя 3 недели культивации, в, е — спустя 5 недель культивации

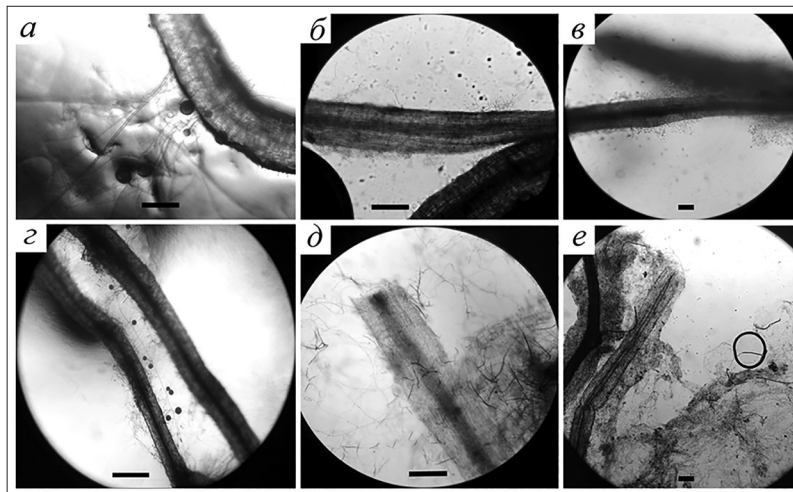


Рис. 4. Микрофотографии волосовидных корней микоризированных *R. irregularis*. а — место инокуляции волосовидного корня мицелием со спорами микоризного гриба; б — фрагмент колонизированного волосовидного корня с мицелием на поверхности; в — мицелий микоризы с формирующимися спорами на мицелии; г — фрагмент волосовидного корня с мицелием и экзоспорами микоризного гриба; д, е — защитный слизистый чехол вокруг волосовидного корня, сформированный микоризным грибом. Увеличения $\times 60$, $\times 150$, $\times 300$. Масштаб: 200 мкм

Процесс взаимодействия гриба и ВК шел неравномерно, поэтапно. Сначала от исходной инокулированной колонии (рис. 5а), состоящей из нескольких спор и фрагмента мицелия, связывающего их, отрастали множественные, одиночные, редко ветвящиеся, тонкие поисковые гифы, которые по мере роста постоянно кон-

тактировали с поверхностью ВК, но довольно часто не проникали внутрь корней. Позже на некоторых участках контакта с активно растущим ВК гриб смог сформировать связь через апрессории и пустить мицелий внутрь корня. Затем в течение трёх дней вокруг таких мест взаимодействия гриба и корня образовывались обильные,

часто ветвящиеся мицелии (рис. 5б), внутри гиф которых можно было наблюдать активное движение клеточного содержимого как к корню растения, так и из него. После этого в течение следующих трёх дней в большинстве мест контактов поискового мицелия и ВК также сформиро-

вались связи между грибом и корнем с образованием обильного мицелия вокруг точек взаимодействия. На десятый день после начала культивирования на гифах наблюдались первые процессы формирования спор на внешнем мицелии (рис. 5в).

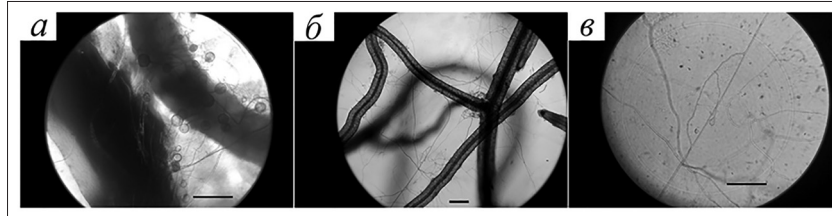


Рис. 5. Микрофотографии волосовидных корней, колонизированных микоризой *R. irregularis*. а — волосовидные корни с инокулятом; б — экзоспores на внешнем мицелии; в — эндоспores из трансформированных везикул. Увеличения $\times 60$ (б) и $\times 150$ (а,в). Масштаб: 200 мкм

Формирование внутрикорневых структур в процессе культивирования в целом не отличалось от почвенных процессов и протекало по мере колонизации волосовидных корней грибом *R. irregularis*. Распределение арбускул и везикул по длине кортекса корня было относительно равномерным. В большинстве случаев формирование арбускул и везикул в участках корня рядом с местами инокуляции занимало от 10 до 15 дней (рис. 6 а–в).

Со временем везикулы постепенно дифференцировались в эндоспores (см. рис. 5 б–г; рис. 7в). При этом

везикулы дробились на несколько небольших круглых клеток — от двух до десятка. У эндоспор непродолжительное время наблюдалась связь с общим мицелием, после чего эта связь разрушалась, либо становилась неразличимой для светового микроскопа. Клетка растения, если процесс спорообразования протекал под клеточной стенкой, заметно увеличивалась в размерах, что приводило к её смещению до покровной части корня вместе с эндоспорами. После этого при нормальном состоянии корня и окружающего субстрата эндоспores выходили в питательную среду (см. рис. 6г).

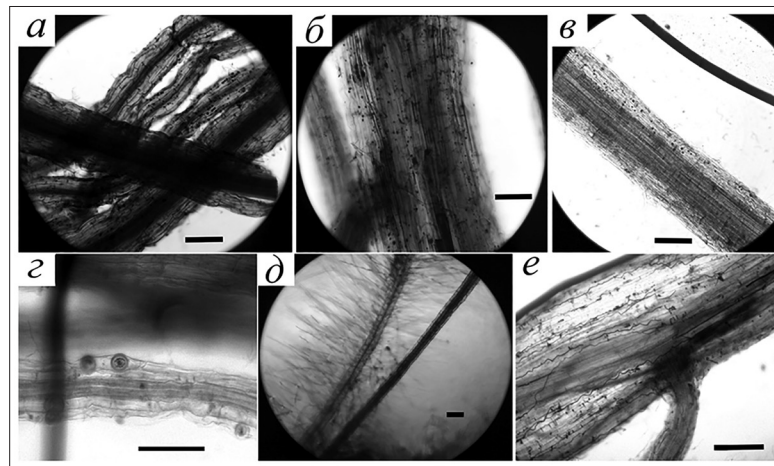


Рис. 6. Микрофотографии окрашенных мицелиев и везикул внутри волосовидных корней, колонизированных микоризой *R. irregularis*. а, б, в — окрашенные колонизированные волосовидные корни с запасующими и трансформирующимися в эндоспores везикулами; г — зрелые эндоспores, готовые к выходу из корня; д — участки волосовидных корней до (слева) и после микоризации (справа) с отсутствующими корневыми волосками; е — участок корня с окрашенным эндомицелием. Увеличения $\times 60$, $\times 150$, $\times 300$. Масштаб: 200 мкм

Закономерностей зависимости частоты трансформации везикул в эндоспores со временем после инокуляции, а также истощения питательной среды обнаружено не было. Однако трансформация в эндоспores значительно усиливалась при отмирании волосовидных корней. При этом последующего смещения клеток к по-

верхности корня и высвобождения эндоспор в субстрат не наблюдалось.

При совместном культивировании волосовидных корней с микоризным грибом у волосовидных корней значительно снижалось образование корневых волосков на поверхностях колонизированных микоризой участ-

ков корня. Это может быть обусловлено эффективным взаимодействием микоризного гриба с волосовидными корнями в выполнении трофической функции и замещением корневых волосков гифами гриба (см. рис. 6 б–в).

Спустя 4 недели после инокуляции микоризным грибом из внутрикорневых везикул началось формирование эндоспор с последующим смещением их к поверхности корня, в то время как образование экзоспор на наружном мицелии корня значительно снижалось при такой длительности культивирования (см. рис. 6а, г–е).

При инокуляции различными концентрациями спор микоризного гриба *R. irregularis* было найдено,

что концентрации инокулята менее 1000 спор на 1 мл не проявляли существенных различий по скорости колонизации корней микоризой, а также не оказывали заметного в световом микроскопе воздействия на морфологическое строение тканей корня. Однако при использовании инокулятов с высокой концентрацией от 5000 до 25000 спор на 1 мл на ВК проявлялись значительные процессы каллусообразования, приводящие к нарушениям покровных тканей. Каллусообразующие процессы преимущественно протекали у клеток кортекса корня, с которыми обычно и контактирует микориза (см. рис. 7г, д) [10].

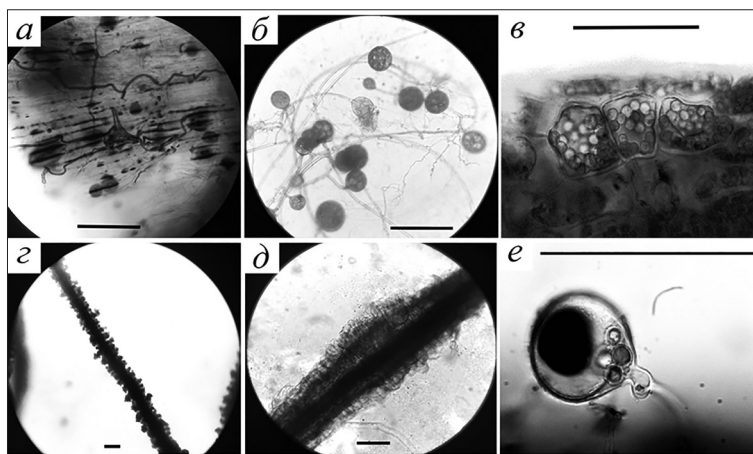


Рис. 7. Микрофотографии волосовидных корней, колонизированных микоризой *R. irregularis*. а — спора на поверхности корня с апрессорием и эндомицелий; б — экзоспоры на внешнем мицелии; в — эндоспоры из трансформированных везикул; г — волосовидные корни, обработанные инокулятом в 25000 спор/мл; д — образование каллуса при использовании концентрации 5000 спор/мл; е — фиксированная экзоспора крупным планом, использованная для обработки волосовидных корней. Увеличения $\times 60$, $\times 150$, $\times 300$, $\times 600$. Масштаб: 200 мкм

Обсуждение

После инокуляции совместная культура волосовидных корней с *R. irregularis* имела замедленный рост по сравнению с контрольной линией стерильных ВК. Вероятно, это обуславливается тем, что значительные структурные изменения корня растения, протекающие у растения хозяина при микоризации, являются стресс-фактором. Действительно известно, что микоризный гриб может забирать до 20% сахаров, синтезируемых растением-хозяином, что может иметь негативный эффект для роста волосовидных корней, которые во время интенсивного роста сами нуждаются в ограниченно синтезируемых сахарах [4] (ведь последние лишены фотосинтезирующих тканей). Процессы микоризации изучены только при взаимодействии гриба и растения в природных условиях, поэтому можно лишь предположить, что микоризный гриб может влиять негативно на ростовые показатели ВК из-за конкуренции за синтези-

руемые питательные вещества, поскольку оба организма являются гетеротрофами.

При дополнительном заражении чашки Петри с совместной культурой микоризного гриба в ВК бактерией *Bacillus licheniformis* было обнаружено усиление формирования вокруг корней защитного чехла. Мицелий микоризного гриба в местах взаимодействия с бактерией образовывал крупные слизистые образования, препятствующие прямому контакту бактерии с корнем. Также при дальнейшем микроскопировании было установлено, что слизистый чехол вокруг ВК, образованный микоризой, по всей видимости, способен задерживать потерю воды, предотвращая пересыхание. Можно предположить, что этот механизм важен для повышения засухоустойчивости растений, однако нельзя исключать того, что он может быть задействован и в противостоянии с фитопатогенами [10].

При длительном (более 3 недель) культивировании микоризованных ВК наблюдалась тенденция к постепенному снижению процессов образования экзоспор. Соотно-

шение к образованию эндоспор, дифференцирующихся из запасающих везикул, при этом значительно увеличивалось (см. рис 7б, в). Подобное явление ранее не описывалось в литературе для систем совместного культивирования микоризы на ВК. В литературе преимущественно описываются работы с эксплантами корней нативных растений [4]. В этих работах микоризный гриб в течение эксперимента давал преимущественно экзоспоры. Вероятно, в ходе экспериментов этих авторов микоризному грибу хватало питательных веществ, запасенных в корне растений до микоризации, благодаря кратковременности совместного культивирования. Большинство экспериментов, описанных в литературе, не отличалось большой длительностью. Самый длительный эксперимент проводился в течение 100 дней, при этом наблюдалось значительное сокращение темпов роста корней после 30 дней культивирования [7]. В нашем исследовании в ходе всех экспериментов использовались культуры ВК, размноженные из одного условного клона, а сама работа с совместными культурами велась дольше 6 месяцев. Учитывая то, что ВК для своего активного роста нуждаются в экзогенной сахарозе ввиду отсутствия фотосинтезирующих частей, гриб, в свою очередь, не способен эффективно использовать сахарозу в субстрате и нуждается в сложных сахарах от растения. Поэтому, вероятно, микориза не может стабильно поддерживать процесс развития экзоспоры. Из-за этого АМ прибегает к процессам накопления всех необходимых веществ в везикулах и дифференциации их в эндоспоры с последующим выводом в субстрат.

В процессе культивирования было отмечено, что при появлении признаков отмирания ВК формирующиеся эндоспоры не выводились в субстрат, а оставались в полостях клеток в зоне 1–3-го ряда клеток покровных тканей (см. рис. 6 г). По всей вероятности, этот механизм обусловлен пережиданием грибом неблагоприятных условий [10].

При инокуляции волосовидных корней спорами *R. irregularis* в больших дозировках были обнаружены значительные структурные нарушения в морфологии волосовидных корней в виде стимуляции калусообразования в области применения инокулята. Исходя из этого, можно полагать, что микоризные биопрепараты для растений при неправильно подобранных концентрациях спор могут нанести вред растительной культуре.

Заключение

Нами был проведен эксперимент с инокулятами с различным содержанием спор гриба. В итоге было

выявлено, что при применении инокулятов с дозировкой более 5000 спор на 1 мл волосовидные корни имели существенные нарушения в своей структуре, а также морфологии корневых клеток. Исходя из полученных данных и сведений из литературы [10], в клетках растения, видимо, значительно увеличивалась центральная вакуоль, что через давление на плазмалемму в итоге приводило к разрушению клеточной стенки и диффузным изменениям корня растений. Ранее такие нарушения в ВК при использовании высококонцентрированных инокулятов спор микоризных грибов не были описаны. Однако можно предположить, что микоризные грибы действуют через влияние на фитогормональную активность, которая связана с попыткой формирования собственной колонии каждой взаимодействующей с корнем спорой, что в итоге приводило к его разрушению. Вероятно, в комплексе взаимодействия между корнем растения и грибом существует механизм, препятствующий повторной колонизации новыми спорами при наличии уже имеющегося развитого симбионта.

Таким образом, нами были получены совместные культуры гриба *R. irregularis* с волосовидными корнями моркови, которые могут быть использованы в фундаментальных исследованиях арбускулярной микоризы, а также, вполне возможно, обладают потенциалом для получения микоризных биопрепаратов, применяемых в сельскохозяйственном производстве.

Работа Минеева Я.П. выполнена в рамках гранта УМНИК (договор 18031ГУ/2022 от 07.06.2022). Экспериментальные исследования Мусина Х.Г и Кулуева Б.Р. проведены в рамках госзадания №122030200143-8.

Литература

1. Кулуев Б.Р., Вершинина Э.Р., Князев А.В., и др. «Косматые» корни растений — важный инструментальный для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производственников // Биомика. — 2015. — № 2. — С. 70–120.
2. Павлова О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Rol-гены *Agrobacterium rhizogenes* // Экологическая генетика. — 2013. — № 11. — С. 59–68.
3. Allen M.F. The Ecology of Mycorrhizae. — Cambridge University Press. — 1991. — 200 p.
4. Campos-Soriano L., Garcia-Garrido J., San Segundo B. Activation of basal defense mechanisms of rice plants by *Glomus intraradices* does not affect the arbuscular mycorrhizal

- symbiosis // *New Phytologist*. — 2010. — Vol. 188. — P. 597–614.
5. Fortin J.A., Bécard G., Declerck S., et al. *Arbuscular mycorrhiza* on root-organ cultures // NRC Research Press Web site. — 2001.
 6. Harley J.L., Harley E.L. A check-list of mycorrhiza in the British flora // *New Phytology*. — 1987. — Vol. 105. — P. 1–102.
 7. Janousková M., Vosátka M. Response to cadmium of *Daucus carota* hairy roots dual cultures with *Glomus intraradices* or *Gigaspora margarita* // *Mycorrhiza*. — 2005. — Vol. 15. — No. 3. — P. 217–224.
 8. Mosse B., Stribley D.P., Le Tacon F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi // *Microbiol. Ecol.* — 1981. — Vol. 5. — P. 136–210.
 9. Renker C., Heinrichs J., Kaldorf M. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field // *Mycorrhiza*. — 2003. — Vol. 13. — P. 191–198.
 10. Schachtman D.P., Read R.J., Ayling S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell // *Plant Physiol.* — 1998. — Vol. 116. — P. 447–453.
 11. Smith S.E., Read D.J. *Mycorrhizal symbiosis*. — Academic Press, 2010. — 800 p.
 12. Tsimilli-Michael M., Strasser R.J. Mycorrhization as a stress adaptation procedure / In: *Mycorrhizal technology in agriculture. From Genes to Bioproducts*. — Birkhauser Verlag, 2002. — P. 199–210.
 13. Wegel E., Schauser L., Sandal N. et al. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection // *MPMI*. — 1998. — Vol. 11(9). — P. 933–936.
 1. Kuluyev BR, Vershinina ZR, Knyazev AV, i dr. «Kosmatyye» korni rasteniy — vazhnyy instrumentariy dlya issledovately i moshchnaya fitokhimbiofabrika dlya proizvodstvennikov. *Biomika* 2015; 2:70–120 (in Russian).
 2. Pavlova OA, Matveyeva TV, Lutova LA. *Rol*-geny *Agrobacterium rhizogenes*. *Ekologicheskaya genetika* 2013; 11:59–68 (in Russian).
 3. Allen MF. *The Ecology of Mycorrhizae*. Cambridge University Press 1991: 200.
 4. Campos-Soriano L, Garcia-Garrido J, San Segundo B. Activation of basal defense mechanisms of rice plants by *Glomus intraradices* does not affect the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 2010; 188:597–614.
 5. Fortin JA, Bécard G, Declerck S, et al. *Arbuscular mycorrhiza* on root-organ cultures. NRC Research Press Web site 2001.
 6. Harley JL, Harley EL. A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytology* 1987; 105:1–102.
 7. Janousková M, Vosátka M. Response to cadmium of *Daucus carota* hairy roots dual cultures with *Glomus intraradices* or *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 2005; 15(3):217–224.
 8. Mosse B, Stribley DP, Le Tacon F. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Microbiol. Ecol* 1981; 5:136–210.
 9. Renker C, Heinrichs J, Kaldorf M. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza* 2003; 13:191–198.
 10. Schachtman DP, Read RJ, Ayling SM. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* 1998; 116:447–453.
 11. Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, 2010: 800.
 12. Tsimilli-Michael M, Strasser RJ. Mycorrhization as a stress adaptation procedure. In: *Mycorrhizal technology in agriculture. From Genes to Bioproducts*. Birkhauser Verlag, 2002: 199–210.
 13. Wegel E, Schauser L, Sandal N et al. Mycorrhiza mutants of *Lotus japonicus* define genetically independent steps during symbiotic infection. *MPMI* 1998; 11(9):933–936.

References

CREATION OF JOINT CULTURES OF HAIRY ROOTS OF CARROTS WITH MYCORRHIZAL FUNGUS *RHIZOPHAGUS IRREGULARIS*

Ya.P. MINEEV¹, M.V. KUZNETSOVA², Kh.G. MUSIN¹, B.R. KULUEV¹

¹ *The Institute of Biochemistry and Genetics is a separate structural subdivision of the Federal State Budgetary Scientific Institution of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,*

² *Research and development enterprise «Bashinkom», Ufa*

The fungus *Rhizophagus irregularis* is widely used in the creation of biopreparations of arbuscular mycorrhiza, but it cannot be cultivated under biotechnological conditions without a host plant. Hairy roots obtained with *Agrobacterium rhizogenes* are a promising system for co-cultivation with arbuscular mycorrhiza fungi. The purpose of this study was to create co-cultures of the fungus *R. irregularis* with hairy roots of carrots, as well as to evaluate their growth rates and mycorrhization. As a result of the work carried

out, joint cultures of *R. irregularis* with hairy roots of carrots were obtained and their microscopic analysis was carried out at different stages of mycorrhization. According to the results of morphometric analysis, a slowdown in the growth rate of hairy roots was noted when interacting with mycorrhiza in the first 2 weeks compared with sterile cultures of hairy roots. Changes in the morphology of hairy roots were noted when high concentrations of spores of the mycorrhizal fungus were introduced in the form of stimulation of callus formation, leading to disruption of the integumentary tissues at the sites of inoculation. The obtained joint cultures of carrot hairy roots with *R. irregularis* can be used in fundamental research of arbuscular mycorrhiza, and also proposed for obtaining mycorrhizal biopreparations in biotechnological production.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, hairy roots, co-cultivation, *Daucus carota*, *Rhizophagus irregularis*.

Address:

Mineev Y.P.
postgraduate student of the Institute of Biochemistry
and Genetics, Ural Federal Research Center
of the Russian Academy of Sciences
E-mail: Laym2101@yandex.ru

Для цитирования:

Минеев Я.П., Кузнецова М.В., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Создание совместных культур волосовидных корней моркови с микоризным грибом *Rhizophagus irregularis*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3):28–36.

For citation:

Mineev Ya.P., Kuznetsova M.V., Musin Kh.G., Kuluev B.R. Creation of joint cultures of hairy roots of carrots with mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3):28–36 (in Russian).

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ФАГОВ ПАТОГЕННЫХ ВИБРИОНОВ И ЕЁ ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

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

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

Vibrio cholerae и *Vibrio parahaemolyticus* являются наиболее важными патогенными вибрионами в области клинической микробиологии и безопасности пищевых продуктов. *Vibrio mimicus* и *Vibrio methchnikovii* занимают третье место после холерных и параземолитических вибрионов по значимости в этиологии острых кишечных инфекций. Все чаще возникает проблема появления измененных в силу ряда причин бактериальных штаммов, являющихся нечувствительными к диагностическим фагам, что создает предпосылки для поиска новых или усовершенствования имеющихся препаратов. Вирулентные формы фагов представляются одним из основных элементов биологической борьбы с бактериальной инфекцией. Только вирулентные бактериофаги могут быть использованы в составе профилактических препаратов. В настоящее время на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в лаборатории бактериофагов идет работа по конструированию новых диагностических и профилактических препаратов. В настоящее исследование взяты бактериофаги *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* и *V. methchnikovii*, которые получены из объектов окружающей среды, а также лизогенных штаммов. Проведено изучение биологических свойств и генетических характеристик фагов патогенных вибрионов для оценки возможности их применения в диагностических или профилактических целях. В результате проведенного исследования составлены две группы из исследованных фагов (вирулентные и умеренные), и на их основе создан экспериментальный «Диагностический бактериофаг для идентификации *V. cholerae* О1 биовара эльтор жидкий». Также ведется работа по конструированию и испытанию коктейля для профилактики холеры.

Ключевые слова: бактериофаги, патогенные вибрионы, коллекция фагов, диагностика, профилактика.

Введение

В современном мире продолжают регистрироваться отдельные вспышки холеры не только в эндемичных, но и других регионах при завозных случаях холеры. Наиболее важными патогенными вибрионами в области клинической микробиологии и безопасности пищевых продуктов являются представители *Vibrio cholerae* и *Vibrio parahaemolyticus*. Штаммы *V. cholerae* присутствуют также в окружающей среде как компонент водной экосистемы и могут вызвать секреторную диарею у людей, что может привести к летальному исходу при отсутствии лечения [20]. *V. parahaemolyticus* вызывает высокую смертность у морских членистоногих, моллюсков и рыб [19]. Для человека в большей степени существует опасность заражения параземолитическими вибрионами в приморских

районах, где в пищевом рационе населения преобладают морепродукты [22]. *V. mimicus* и *V. methchnikovii* стоят на третьем месте после холерных и параземолитических вибрионов по значимости в этиологии острых кишечных инфекций, потому что *V. mimicus*, как и холерный вибрион, способен вызывать гастроэнтерит и диарею [27], а заражение *V. methchnikovii* может привести к бактериемии и раневым инфекциям.

В настоящее время в ряде специализированных институтов созданы стандартные наборы фагов, к которым чувствительны те или иные штаммы микроорганизмов, и разработаны схемы типирования [3, 9–11, 18]. Вирулентные формы фагов являются одним из основных элементов биологической борьбы с бактериальной инфекцией [21, 26], так как они могут быть использованы в составе профилактических препаратов [4, 5]. В то же время существует проблема появления измененных штаммов, нечувствительных к существующим фагам, что создает предпосылки для поиска новых или усовершенствования имеющихся препаратов.

Так, на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в лаборатории

© 2023 г. Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Аноприенко А.О.

* **Автор для переписки:**

Погожова Марина Павловна

младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов

E-mail: pogojovala_mp@antiplague.ru

бактериофагов проводится работа по конструированию новых диагностических и профилактических препаратов. В связи с этим актуально изучение биологических свойств бактериофагов патогенных вибрионов одновременно с их генетической структурой.

Материалы и методы

В настоящее исследование взяты бактериофаги *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. methchnikovii*. Данные фаги выделены из объектов окружающей среды, а также лизогенных штаммов и находятся в коллекции-депозитарии лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Изучение биологических свойств проводили общепринятыми методами [13]. Специфичность бактериофагов патогенных вибрионов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae* (50 штаммов), *Pseudomonadaceae* (20 штаммов), *Enterobacteriaceae* (40 штаммов), которые не лизировались испытуемыми фагами. Образцы бактериофагов просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011. Электронограммы получены при помощи CDC-камеры Olimpus-SIS-Veleta и программного обеспечения iTEM-TEM imaging Platform.

Выделение ДНК фагов проводили в соответствии со стандартными методиками [23]. Количество ДНК контролировали флуориметром Quanti Fluor. Для контроля качества ДНК использовали метод электрофореза в 0,8%-ном агарозном геле. Отсутствие бактериальных хромосом в пробах подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Раствор фаговой ДНК хранили

при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. ДНК фагов секвенирована с помощью полногеномного секвенатора Miseq (Illumina).

Биоинформационный анализ проводили общепринятыми методами. Оценку первичных данных секвенирования осуществляли с применением программы FastQC [15]. Для тримминга и коррекции ридов использовали алгоритмы Trimmomatic [17]. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [16]. Сравнение собранных геномов бактериофагов с аннотированными последовательностями известных бактериофагов проводили при помощи алгоритма BLASTN 2.2.29 (Basic Local Alignment Search Tool – средство поиска основного локального выравнивания. Семейство компьютерных программ. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Наличие или отсутствие генов, характерных для умеренных бактериофагов (генетических детерминант факторов антибиотикорезистентности, токсинов и интеграз), проверяли при помощи базы данных и разработанного программного обеспечения под названием «PhageAnalyzer» (<http://antiplague.ru/phageanalyzer/>) [8], созданных на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Прогнозирование функций белков осуществляли при помощи алгоритма программы BLASTX 2.12.0+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [14].

Результаты

Морфологический анализ методом электронной микроскопии показал, что исследованные бактериофаги принадлежат к трем морфотипам по Ackerman H.V., 1987 – подовирусы, миовирусы (рис. 1) и фибровирус (рис. 2) (табл. 1).

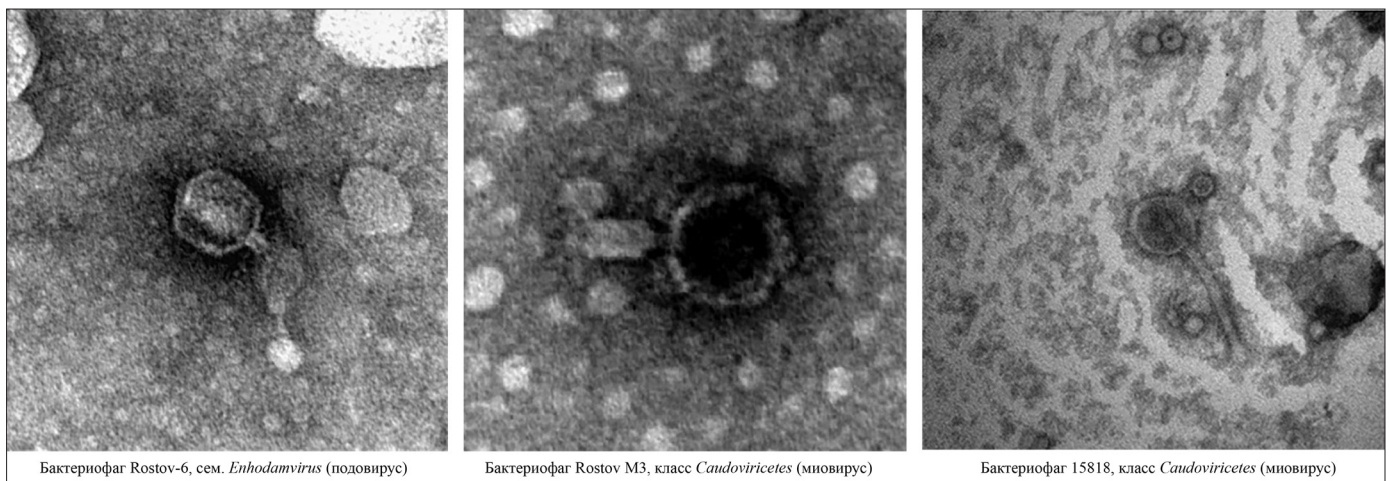


Рис. 1. Морфология вирионов бактериофагов патогенных вибрионов класса *Caudoviricetes*

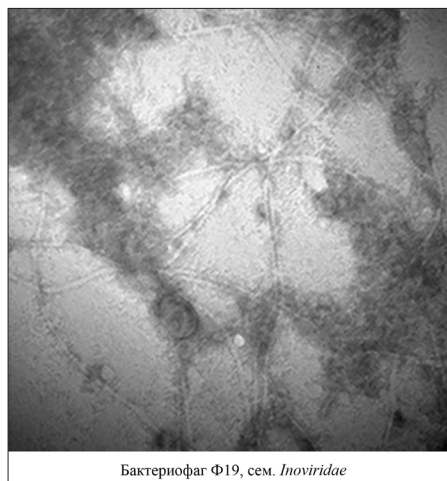


Рис. 2. Морфология бактериофага патогенного вибриона *V. mimicus* порядка *Tubulavirales* (фибровирус)

Из таблицы 1 видно, что холерные бактериофаги принадлежат классу *Caudoviricetes* (подовирусы и миовирусы) и семействам *Autographiviridae*, *Enhodamvirus* и *Zobellviridae* (подовирусы), фаги *V. parahaemolyticus* (по-

довирусы) и *V. methchnikovii* (миовирусы) также входят в класс *Caudoviricetes*. Данные семейства характеризуются геометрией «голова-хвост». Головка имеет икосаэдрическую симметрию и различный размер от 44×51,5 нм (Rostov-1 сем. *Autographiviridae*) до более крупной 63×58 нм (*Vibrio* phage 536 класс *Caudoviricetes*). Головчатые бактериофаги различались по строению хвоста. Фаги семейств *Autographiviridae*, *Enhodamvirus* и *Zobellviridae* имеют короткий несократимый хвост размером от 9 нм (Saratov-15 сем. *Zobellviridae*) до 13,78 нм (Rostov 13 сем. *Autographiviridae*) и морфологически относятся к подовирусам. Другие фаги класса *Caudoviricetes* имеют короткий (11,3 нм – Rostov M3) или длинный (от 129 нм до 102,3 нм – Rostov 7, 15818, Ф89) сократимый хвост и относятся к миовирусам. Фаг *V. mimicus* Φ19 является фибровирусом и относится к порядку *Tubulavirales* семейства *Inoviridae*.

После проведения анализа нуклеотидных последовательностей экспериментальные бактериофаги патогенных вибрионов отнесены к ДНК-содержащим двуцепочечным фагам (табл. 2).

Таблица 1

Характеристика фаговых корпускул

| Название бактериофага | Хозяин | Размер и строение головки | Размер и строение хвоста | Морфотип по Ackerman H.B., 1987 [12] | Классификация по Turner D. et al., 2021, 2023 [24, 25] |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| Rostov-1 | <i>V. cholerae</i> O1 El Tor | 44×51,5 нм (многогранная головка) | 12,5 нм (короткий несократимый хвост) | С подовирусы | Класс <i>Caudoviricetes</i> Сем. <i>Autographiviridae</i> |
| Rostov 13 | | 48,26×47,15 нм (многогранная головка) | 13,78 нм (короткий несократимый хвост) | | |
| Rostov-6 | <i>V. cholerae</i> Classical и El Tor | 45,3×51 нм (многогранная головка) | 11 нм (короткий несократимый хвост) | С подовирусы | Класс <i>Caudoviricetes</i> Сем. <i>Enhodamvirus</i> |
| Saratov-12 | <i>V. cholerae</i> O1 El Tor | 44×64 нм (многогранная головка) | 12,7 нм (короткий несократимый хвост) | С подовирусы | Класс <i>Caudoviricetes</i> Сем. <i>Zobellviridae</i> |
| Saratov-15 | | 45×62 нм (многогранная головка) | 9 нм (короткий несократимый хвост) | | |
| Rostov 7 | <i>V. cholerae</i> O1 El Tor | 45,3×51 нм (многогранная головка) | 102,3 нм (длинный сократимый хвост) | А миовирусы | Класс <i>Caudoviricetes</i> |
| Rostov M3 | <i>V. cholerae</i> Classical и El Tor | 45,1×53,3 нм (многогранная головка) | 11,3 нм (короткий сократимый хвост) | | |
| Vibrio phage 536 | <i>V. parahaemolyticus</i> | 63×58 нм (многогранная головка) | 10 нм (короткий несократимый хвост) | С подовирусы | Класс <i>Caudoviricetes</i> |
| 17748 | | 48×54 (многогранная головка) | 11 нм (короткий несократимый хвост) | | |
| 19151 | | 60×58 нм (многогранная головка) | 10 нм (короткий несократимый хвост) | | |
| 19166 | | 46×48 нм (многогранная головка) | 10,3 нм (короткий несократимый хвост) | | |
| 15818 | <i>V. methchnikovii</i> | 56×58 нм (многогранная головка) | 123 нм (длинный сократимый хвост) | А миовирусы | Класс <i>Caudoviricetes</i> |
| Ф89 | | 53×57 нм (многогранная головка) | 129 нм (длинный сократимый хвост) | | |
| Φ19 | <i>V. mimicus</i> | Филаментозный фаг | | Ф фибровирус | Порядок <i>Tubulavirales</i> ; сем. <i>Inoviridae</i> |

Таблица 2

**Анализ нуклеотидных последовательностей геномов экспериментальных
бактериофагов патогенных вибрионов**

| № | Название фага | Хозяин | Размер генома пары нуклеотида | G+C состав | Номер доступа в GenBank (NCBI) |
|----|------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------|--------------------------------|
| 1 | Rostov-1 | <i>V. cholerae</i> O1 El Tor | 37247 | 42,8% | MG957431 |
| 2 | Rostov 13 | | 36326 | 42% | OK169294, OK169295 |
| 3 | Saratov-12 | | 48368 | 42,8% | MT066160.1 |
| 4 | Saratov-15 | | 51082 | 42,7% | MT767883.1 |
| 5 | Rostov 7 | | 45903 | 45,7% | MK575466.1 |
| 6 | Rostov-6 | <i>V. cholerae</i> Classical и El Tor | 39934 | 50,7% | MH105773 |
| 7 | Rostov M3 | | 46669 | 45,6% | MN379460-MN379463 |
| 8 | Vibrio phage 536 | <i>V. parahaemolyticus</i> | 42241 | 41,7% | OK181169-OK181174 |
| 9 | 17748 | | 24466 | 40,64% | - |
| 10 | 19151 | | 13718 | 41,54% | - |
| 11 | 19166 | | 16647 | 41,52% | - |
| 12 | 15818 | <i>V. methchnikovii</i> | 36058 | 44,46% | - |
| 13 | Φ89 | | 35443 | 46,06% | - |
| 14 | Φ19 | <i>V. mimicus</i> | 7328 | 47,94% | - |

Из таблицы 2 видно, что размеры геномов исследованных бактериофагов патогенных вибрионов колеблются от 7 до 51 тысячи пар нуклеотидов, что соответствует норме для данной группы фагов класса *Caudoviricetes* и порядка *Tubulavirales*. Семь бактериофагов *V. cholerae* и один *V. parahaemolyticus* депонированы в международной базе данных GenBank (NCBI).

В результате биоинформационного анализа в структуре геномов вибриофагов Rostov-6 и Rostov 7

найжены интегразы (GenBank: YP_009153053.1, YP_009043902.1, YP_009043892.1), а в геноме Φ19 – токсин (GenBank: EKL19669.1), что свидетельствует об умеренной природе фагов. Остальные фаги считаются вирулентными, поскольку не обнаружены генетические детерминанты, характерные для умеренных фагов.

Наряду с морфологической и генетической структурой фагов были охарактеризованы их биологические свойства. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Биологические свойства бактериофагов патогенных вибрионов

| Название | Хозяин | Специфичность ¹ | Температура инактивации, °С | Устойчивость к хлороформу ² | Литическая активность, % | Размер негативных колоний |
|------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--|--------------------------|---|
| Rostov-1 | <i>V. cholerae</i> O1 El Tor | + | 60–70 °С в течение 30 минут | + | 57,5 | Прозрачные негативные колонии двух типов: мелкие, диаметром 1,0–1,5 мм и крупные 3,0–6,0 мм |
| Rostov 13 | | | | | 97,0 | Прозрачные негативные колонии двух типов (крупные и мелкие) размером 2–5 мм |
| Saratov-15 | | | | | 66,8 | |
| Saratov-12 | | | | | 65,6 | Прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм |
| Rostov 7 | | | | | 66,3 | |

| | | | | | | |
|------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------|---|------|--|
| Rostov M3 | <i>V. cholerae</i> Classical и El Tor | + | 60–70 °С в течение 30 минут | + | 83,3 | Прозрачные негативные колонии диаметром 1,5–2 мм |
| Rostov-6 | | | | | 64,6 | Прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм |
| Vibrio phage 536 | <i>V. parahaemolyticus</i> | + | 60–70 °С в течение 30 минут | + | 82,6 | Прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм |
| 17748 | | | | | 38,8 | |
| 19151 | | | | | 40,1 | |
| 19166 | | | | | 28,6 | |
| 15818 | <i>V. methchnikovii</i> | + | 60–70 °С в течение 30 минут | + | 35,7 | Прозрачные негативные колонии диаметром 1,5–2 мм |
| Ф89 | | | | | 40,1 | |
| Ф19 | <i>V. mimicus</i> | + | 75–80 °С в течение 30 минут | - | 20,0 | Прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм |

Примечание: 1: (+) – специфичность бактериофага подтверждена; 2: (+) – бактериофаг устойчив к хлороформу, (-) – бактериофаг не устойчив к хлороформу

Из таблицы 3 видно, что пять холерных бактериофагов (Rostov-1, Rostov 7, Rostov 13, Saratov-12 и Saratov-15) обладают более высокой литической активностью в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor по сравнению с другими холерными фагами El Tor, взятыми из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Два холерных бактериофага (Rostov M3 и Rostov-6) лизируют с высокой активностью одновременно вибрионы *V. cholerae* O1 серогруппы двух биоваров Classical и El Tor. Фаги 536, 17748, 19151 и 19166 активны в отношении *V. parahaemolyticus* с литической активностью от 28,6 до 82,6%; фаги Ф89 и 15818 активны в отношении *V. methchnikovii* с литической активностью от 35,7 до 40,1% соответственно, а фаг Ф19, лизируя *V. mimicus*, имеет литическую активность 20%.

Исследованные фаги класса *Caudoviricetes* устойчивы к хлороформу, тогда как представители порядка *Tubulavirales* (Ф19) чувствительны, но термостабильны при прогревании от 75 °С до 80 °С, что характерно для filamentозных фагов (табл. 3).

Стоит отдельно отметить холерный бактериофаг Rostov 13, который активен в отношении *V. cholerae* серогруппы O1 биовара El Tor с литической активностью 97%. На газоне индикаторной культуры бактериофаг

Rostov 13 образует прозрачные негативные колонии двух типов (крупные и мелкие) размером от 2 до 5 мм (табл. 3). При инкубации чашек при 37 °С более двух суток у холерного бактериофага Rostov 13 происходило формирование небольших ореолов вокруг негативных колоний порядка 2–3 мм. (рис. 3)



Рис. 3. Морфология негативных колоний фага Rostov 13 (*V. cholerae*).

Согласно данным литературы, появление полупрозрачных ореолов свидетельствует о продукции бактериофагом растворимого фермента, подобного полисахарид-деполимераза в хвостовом отростке. Данные ферменты способствуют разрушению капсульных полисахаридов и проникновению фага в клетку-мишень [2, 6]. В результате биоинформационного анализа у бактериофага Rostov 13 обнаружена ORF (Open Reading Frame — открытая рамка считывания), кодирующая пептидогликанлизирующий фермент гидролазу (GenBank: UCR91352.1), что объясняет появление полупрозрачных ореолов вокруг негативных колоний на чашках при инкубировании.

Сотрудниками ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в лаборатории бактериофагов был сконструирован экспериментальный «Диагностический бактериофаг для идентификации *V. cholerae* O1 биовара эльтор жидкий» на основе фагов Rostov 13 и Rostov-1. Проведены межучрежденческие испытания в Российском НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора [7]. Стоит отметить, что экспериментальный «Диагностический бактериофаг для идентификации *V. cholerae* O1 биовара эльтор жидкий» эффективнее лизировал штаммы холерного вибриона, выделенные после 2000 года. Это связано с неизбежной эволюционной изменчивостью бактериофагов и их хозяев. Свежевыделенные бактериофаги эффективнее лизируют новые штаммы микроорганизмов.

Также в лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора были проведены эксперименты по оценке профилактической эффективности фаговой смеси *in vivo* в тонкой кишке взрослых кроликов. В работу были отобраны вирулентные холерные фаги Rostov 13 и Rostov M3, лизирующие вибрионы O1 серогруппы биоваров Classical и El Tor. В результате проведенных экспериментов [1] была показана высокая профилактическая эффективность исследованной фаговой смеси.

Обсуждение

Данные, полученные в результате изучения биологических свойств и генетических характеристик фагов, внесены в созданную нами базу данных. Разработка защищена свидетельством о государственной регистрации базы данных № 2022620881 «Коллекция-депозитарий бактериофагов микроорганизмов III—IV группы патогенности». На основании полученных генетических характеристик определена вирулентная либо умеренная природа исследованных бактериофагов патогенных вибрионов.

Сформирована коллекция, в составе которой вирулентные фаги являются перспективными кандидатами для создания профилактического коктейля против заболеваний, вызываемых патогенными вибрионами, а также для усовершенствования схем фаготипирования. Например, создан коктейль из холерных бактериофагов [1], обладающий высокой литической активностью в отношении хозяина, а также генетической характеристикой, отвечающей требованиям, предъявляемым при создании профилактических препаратов [4, 5]. Вирулентный вибриофаг 536, активный в отношении *V. parahaemolyticus* с высокой литической активностью, также перспективен для дальнейшего исследования в качестве компонента для профилактического коктейля.

Коллекция из умеренных фагов успешно используется для усовершенствования схем диагностики при мониторинге патогенных вибрионов из окружающей среды. Например, умеренный бактериофаг Rostov-6, с высокой литической активностью в отношении холерного вибриона O1 серогруппы двух биоваров Classical и El Tor, позволяет проводить ускоренную идентификацию микроорганизмов вида *V. cholerae* и дифференциацию их от микроорганизмов близкородственных видов и семейств. Разработка защищена патентом № 2019141701 «Способ идентификации холерных вибрионов O1 серогруппы биоваров Classical и El Tor». Умеренный фаг *V. mimicus* Ф19 используется для дифференциации фагов *V. mimicus* и холерных с помощью индикаторного штамма *V. cholerae* 1322-69 O37 серогруппы, что дает возможность отличить их от холерных фагов при исследовании проб воды на вибриофаги. Разработка защищена патентом № 2008109617/13 «Способ выделения и дифференциации фага *Vibrio mimicus*».

Созданный в лаборатории бактериофагов (Ростовский-на-Дону противочумный институт) экспериментальный «Диагностический бактериофаг для идентификации *V. cholerae* O1 биовара эльтор жидкий» имеет спектр литической активности, сопоставимый с бактериофагом эльтор из коммерческого препарата производства Российский НИПЧИ «Микроб» [7]. Объединение созданного нами препарата с уже существующим позволит повысить достоверность и точность диагностики холерных вибрионов биовара El Tor.

Остальные исследованные вибриофаги, активные в отношении *V. parahaemolyticus* и *V. methchnikovii*, хоть и являются вирулентными, но имеют низкую литическую активность в отношении хозяина. Необходимо провести их дальнейшие исследования для повышения их способности эффективно лизировать патогенные вибрионы.

Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Создана регулярно пополняемая база данных «Коллекция-депозитарий бактериофагов микроорганизмов III–IV группы патогенности», включающая в себя биологические свойства и генетические характеристики фагов. База данных будет способствовать более быстрой и эффективной разработке диагностических или профилактических препаратов.

2. Из сформированной коллекции подобраны вирулентные бактериофаги патогенных вибрионов, перспективные для создания профилактического коктейля.

3. Выделены и изучены бактериофаги патогенных вибрионов, перспективные для диагностических препаратов, используемых для мониторинга проб из окружающей среды.

Литература

1. *Аноприенко А.О. и др.* Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16. — № 3. — С. 10–13.
2. *Воложанцев Н.В. и др.* Бактериофаги и фаговые полисахарид-деполимеразы как средство преодоления лекарственной резистентности патогенных бактерий // Биотехнологические проблемы развития генетических технологий в Российской Федерации: Сборник тезисов научной конференции, Москва, 10–11 ноября 2020 года. — Москва: Кемеровский государственный университет, 2020. — С. 10–12.
3. *Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д.* Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры // Клиническая лабораторная диагностика. — 2016. — Т. 61. — № 12. — С. 849–852.
4. Государственная фармакопея РФ, XIV изд., том 1–4 (2018). URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>.
5. *Каргина Т.М. и др.* Разработка фармакопейных стандартов качества на лекарственные препараты-бактериофаги // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2019. — Т. 19. — № 4. — С. 233–241.
6. *Книрель Ю.А. и др.* Расщепление по различным механизмам капсульных полисахаридов *Acinetobacter baumannii* фаговыми деполимеразами // Биохимия. — 2020. — Т. 85. — № 5. — С. 663–671.
7. *Коровкина Г.И. и др.* Исследование экспериментальных фагов для идентификации холерных вибрионов биовара эльтор // Состояние и перспективы разработки медицинских средств защиты от поражающих факторов радиационной, химической и биологической природы. — 2019. — С. 173–174.
8. *Погожова М.П. и др.* PhageAnalyzer — программа для анализа данных полногеномного секвенирования бактериофагов. — 2019. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2019616060 от 17.05.2019. URL: <http://antiplague.ru/phageanalyzer>.
9. *Саяпина Л.В. и др.* Характеристика нового бактериофага диагностического сибиреязвенного Гамма А-26 жидкого // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2011. — № 1(41). — С. 36–39.
10. *Светоч Э.А. и др.* Диагностический бактериофаг V32 как инструмент для быстрой идентификации *Escherichia coli* серогруппы O157 // Клиническая лабораторная диагностика. — 2019. — Т. 64. — № 1. — С. 57–64.
11. *Сульдина Е.В.* Разработка ускоренной схемы идентификации листерий с помощью фагового биопрепарата L. M 4 УЛГАУ // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. — 2020. — № 4(52). — С. 191–197.
12. *Ackerman H.B.* Bacteriophage taxonomy in 1987 // Microbiol. Sci. — 1987. — Vol. 4(7). — P. 214–218.
13. *Adams M.H.* Bacteriophages. — Interscience publishers, 1959.
14. *Altschul S.F. et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic acids research. — 1997. — Vol. 25. — No. 17. — P. 3389–3402.
15. *Andrews S. et al.* FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. — 2010. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
16. *Bankevich A. et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // Journal of computational biology. — 2012. — Vol. 19. — No. 5. — P. 455–477.
17. *Bolger A.M., Lohse M., Usadel B.* Trimmomatic: a flexible trimmer for *Illumina* sequence data // Bioinformatics. — 2014. — Vol. 30. — No. 15. — P. 2114–2120.
18. *Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.D.* Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion // Microbiology and molecular biology reviews. — 2004. — Vol. 68. — No. 3. — P. 560–602.
19. *Chonsin K. et al.* Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand // FEMS Microbiology Letters. — 2016. — Vol. 363. — No. 2. — Art. fmv222. doi: 10.1093/femsle/fmv222.
20. *Colwell R.R.* Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease // International microbiology. — 2004. — Vol. 7. — No. 4. — P. 285–289.
21. *D’Andrea M.M. et al.* ϕ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage // Scientific reports. — 2017. — Vol. 7. — No. 1. — Art. 2614. doi: 10.1038/s41598-017-02788-9.

22. Levin R.E. *Vibrio parahaemolyticus*, a notably lethal human pathogen derived from seafood: a review of its pathogenicity, characteristics, subspecies characterization, and molecular methods of detection // Food Biotechnology. — 2006. — Vol. 20. — No. 1. — P. 93–128.
 23. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Translation from English. — 1984.
 24. Turner D., Kropinski A.M., Adriaenssens E.M. A roadmap for genome-based phage taxonomy // Viruses. — 2021 Mar. — Vol. 18. — Vol. 13(3). — Art. 506. doi: 10.3390/v13030506.
 25. Turner D., Shkoporov A.N., Lood C. et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee // Arch. Virol. — 2023. — Vol. 168. — No. 2. — Art. 74. doi: 10.1007/s00705-022-05694-2.
 26. 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. — Art. 14187. doi: 10.1038/ncomms14187.
 27. Zago V. et al. Virulence-associated factors in *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 and *V. mimicus* strains isolated in ornamental fish species // Journal of fish diseases. — 2017. — Vol. 40. — No. 12. — P. 1857–1868.
- References**
1. Anopriyenko AO i dr. Sozdaniye eksperimental'nogo profilakticheskogo preparata na osnove kholernykh bakteriofagov. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2020; 16(3):10–13 (in Russian).
 2. Volozhantsev NV i dr. Bakteriofagi i fagovyye polisakharid-depolimerazy kak sredstvo preodoleniya lekarstvennoy rezistentnosti patogennykh bakteriy. Bioeticheskiye problemy razvitiya geneticheskikh tekhnologiy v Rossiyskoy Federatsii: Sbornik tezisov nauchnoy konferentsii, Moskva, 10–11 noyabrya 2020 goda. Moscow: Kemerovskiy gosudarstvennyy universitet, 2020:10–12 (in Russian).
 3. Gayevskaya NYe, Makedonova LD. Ispolzovaniye bakteriofagov v laboratornoy diagnostike kholery. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2016; 61(12):849–852 (in Russian).
 4. Gosudarstvennaya farmakopeya RF, XIV izd, tom 1–4 (2018). URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (in Russian).
 5. Kargina TM i dr. Razrabotka farmakopeynykh standartov kachestva na lekarstvennyye preparaty-bakteriofagi. Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye 2019; 19(4):233–241 (in Russian).
 6. Knirel' YuA i dr. Rasshchepeniye po razlichnym mekhanizmam kapsul'nykh polisakharidov *Acinetobacter baumannii* fagovymi depolimerazami. Biokhimiya 2020; 85(5):663–671 (in Russian).
 7. Korovkina GI i dr. Issledovaniye eksperimental'nykh fagov dlya identifikatsii kholernykh vibriionov biovara el'tor. Sostoyaniye i perspektivy razrabotki meditsinskikh sredstv zashchity ot porazhayushchikh faktorov radiatsionnoy, khimicheskoy i biologicheskoy prirody 2019: 173–174 (in Russian).
 8. Pogozhova MP i dr. PhageAnalyzer — programma dlya analiza dannykh polnogenomnogo sekvenirovaniya bakteriofagov 2019. Svidetel'stvo o gosudarstvennoy registratsii programmy dlya EVM № 2019616060 ot 17.05.2019. URL: <http://antiplague.ru/phageanalyzer>.
 9. Sayapina LV i dr. Kharakteristika novogo bakteriofaga diagnosticheskogo sibireyazvennogo Gamma A-26 zhidkogo. Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye 2011; 1(41):36–39 (in Russian).
 10. Svetoch EA i dr. Diagnosticheskiy bakteriofag V32 kak instrument dlya bystroy identifikatsii *Escherichia coli* serogruppy O157. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2019; 64(1):57–64 (in Russian).
 11. Sul'dina YeV. Razrabotka uskorennoy skhemy identifikatsii listeriy s pomoshch'yu fagovogo biopreparata L. M 4 ULGAU. Vestnik Ul'yanovskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii 2020; 4(52):191–197 (in Russian).
 12. Ackerman HB. Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol Sci 1987; 4(7):214–218.
 13. Adams MH. Bacteriophages. Interscience publishers, 1959.
 14. Altschul SF et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research 1997; 25(17):3389–3402.
 15. Andrews S et al. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
 16. Bankevich A et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of computational biology 2012; 19(5):455–477.
 17. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for *Illumina* sequence data. Bioinformatics 2014; 30(15):2114–2120.
 18. Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiology and molecular biology reviews 2004; 68(3):560–602.
 19. Chonsin K et al. Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand. FEMS Microbiology Letters 2016; 363(2):fmv222. doi: 10.1093/femsle/fmv222.
 20. Colwell RR. Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. International microbiology 2004; 7(4):285–289.
 21. D'Andrea MM et al. ϕ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. Scientific reports 2017; 7(1):2614. doi: 10.1038/s41598-017-02788-9.

22. Levin RE. *Vibrio parahaemolyticus*, a notably lethal human pathogen derived from seafood: a review of its pathogenicity, characteristics, subspecies characterization, and molecular methods of detection. *Food Biotechnology* 2006; 20(1):93–128.
23. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Translation from English 1984;
24. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses* 2021;Mar. 18. 13(3):506. doi: 10.3390/v13030506.
25. Turner D, Shkoporov AN, Lood C et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch Virol* 2023; 168(2):74. doi: 10.1007/s00705-022-05694-2.
26. Yen M, Cairns LS, Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. *Nature communications* 2017; 8:14187. doi: 10.1038/ncomms14187.
27. Zago V et al. Virulence-associated factors in *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 and *V. mimicus* strains isolated in ornamental fish species. *Journal of fish diseases* 2017; 40(12):1857–1868.

CREATION OF A COLLECTION OF PATHOGENIC *VIBRIO* PHAGES AND ITS APPLICATION FOR DIAGNOSTIC AND PREVENTIVE PURPOSES

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

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

Vibrio cholerae and *Vibrio parahaemolyticus* are the most important pathogenic vibrios in clinical microbiology and food safety. *Vibrio mimicus* and *Vibrio methchnikovii* rank third after cholera and parahemolytic vibrios in importance in the etiology of acute intestinal infections. Increasingly, the problem arises of the emergence of bacterial strains that are not sensitive to diagnostic phages, which, due to a number of reasons, create the prerequisites for finding new or improving available drugs. Virulent forms of phages are one of the main elements of the biological control of bacterial infection. Only virulent bacteriophages can be used in prophylactic preparations. Currently, on the basis of Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor in the laboratory of bacteriophages is working on the design of new diagnostic and prophylactic preparations. Bacteriophages *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* and *V. methchnikovii*, which are obtained from environmental objects, as well as lysogenic strains, are taken into this study. A study of the biological properties and genetic characteristics of pathogenic vibrio phages was carried out to assess the possibility of their use for diagnostic or prophylactic purposes. As a result of the study, two groups of the studied phages (virulent and temperate) were compiled, and on their basis an experimental «Diagnostic bacteriophage for the identification of *V. cholerae* O1 biovar Eltor liquid» was created, and work is also underway to design and test a cocktail for the prevention of cholera.

Keywords: bacteriophages, pathogenic vibrios, phage collection, diagnostics, prophylactics.

Address:

Pogozhova M.P.

Junior researcher, laboratory of bacteriophages

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

E-mail: pogojova_mp@antiplague.ru

Для цитирования:

Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Анопrienко А.О. Создание коллекции фагов патогенных вибрионов и её применение в диагностических и профилактических целях. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2023; 19(3):37–45.

For citation:

Pogozhova M.P., Geavskaya N.E., Tyurina A.V., Anoprienko A.O. Creation of a collection of pathogenic *Vibrio* phages and its application for diagnostic and preventive purposes. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(3):37–45 (in Russian).

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЛИАНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИЙ У КОРОНАПОЗИТИВНЫХ БОЛЬНЫХ

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

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

Новая коронавирусная инфекция COVID-19 по праву считается главной чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения. В течение заболевания у пациентов развивается пневмония, требующая госпитализации или прогрессирующая в связи с присоединением вторичных осложнений бактериальной или грибковой природы. В большинстве случаев осложнения связаны с присоединением полиантибиотикорезистентных инфекционных агентов. В связи с этим разработка альтернативных способов лечения инфекций является одним из приоритетных направлений современной медицины. В данной работе осуществлены поиск и характеристика бактериофагов, изолированных из полиантибиотикорезистентных (имеющих 3 и более маркеров резистентности) клинически значимых штаммов. Культуры микроорганизмов получены из образцов мокроты от коронапозитивных больных с внебольничной пневмонией. Изучена чувствительность культур *Pseudomonas aeruginosa* к различным антибактериальным препаратам и полученным из *P. aeruginosa* (штаммы 45528 и 46115) бактериофагам. Установлено, что исследованные нами фаги принадлежат к порядку Caudovirales семейства Siphoviridae и относятся к IV морфогруппе, что подтверждают электронно-микроскопические и молекулярно-генетические исследования. Проведенное секвенирование и биоинформационный анализ двух выделенных фагов показал отсутствие генов антибиотикорезистентности и токсинов. В геномах исследованных бактериофагов обнаружены нуклеотидные последовательности, которые гомологичны на 97–98% фаговым интегразам. Показано, что данные фаги являются умеренными и не могут быть использованы в качестве лечебных препаратов, так как обладают узким спектром литической активности (16,7–19%). Перспективным направлением, на наш взгляд, являются дальнейшие исследования по получению вирулентных мутантов данных бактериофагов и поиск новых фагов, активных в отношении полиантибиотикорезистентных штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, бактериофаги, антибиотикорезистентность.

Введение

Проблема COVID-19 требует разработки новых прогрессивных подходов в диагностике и лечении. Особое внимание требуется в связи с развитием пневмонии с присоединением вторичных осложнений бактериальной или грибковой природы [10, 11].

В настоящее время большую угрозу для здоровья людей несут инфекции, возбудителями которых явля-

ются микроорганизмы с множественной лекарственной устойчивостью. Ситуация усугубляется и тем, что все чаще появляются сообщения о бактериях, обладающих так называемой панрезистентностью ко всем известным антибиотикам и химиопрепаратам. Сегодня такие патогены называются «супербактериями» (в зарубежной научной литературе — «superbugs»). Как правило, супербактериями оказываются возбудители внутрибольничных инфекций, что резко ухудшает прогноз заболевания. Кроме того, показана их способность к обмену генетической информацией между совершенно разными видами, что открыло бактериям путь к бесконечной адаптации. Их количество и агрессивность постоянно возрастают, что становится глобальной проблемой не только здравоохранения, но практически всего общества [2, 4]. Нельзя не отметить и тот тревожный факт, что в литературе имеются данные о повышенной устойчивости подобных возбудителей и к известным дезинфектантам [6].

© 2023 г. Гаевская Н.Е., Аноприенко А.О., Погожова М.П., Тюрина А.В., Цимбалистова М.В.

* Автор для переписки:

Гаевская Наталья Евгеньевна

к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории бактериофагов, и.о. начальника отдела диагностических препаратов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
E-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

Пневмония — одна из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире. Во многом это обусловлено тем, что в связи с трудностями идентификации возбудителя и несвоевременном назначении адекватного лечения у части больных возникают осложнения инфекции. В большом количестве случаев осложнения связаны с присоединением именно полиантибиотикорезистентных инфекционных агентов.

В этой ситуации возникает необходимость поиска альтернативных подходов, новых лекарственных препаратов, которые в комплексе с антибиотиками позволили бы повысить эффективность лечения. Перспективным направлением в усовершенствовании профилактики и лечения инфекций, в том числе пневмоний, является использование специфичных лечебных бактериофагов, которые могут лизировать как устойчивые, так и чувствительные к антибиотикам штаммы бактерий. Как известно, препараты бактериофагов обладают рядом преимуществ: они не токсичны, характеризуются целенаправленной активностью в отношении определенного вида, не вызывают развития дисбактериозов и других побочных явлений [8]. Следовательно, они считаются безопасной альтернативой лекарственным препаратам при лечении бактериальных заболеваний. Нельзя не учитывать и возможные перспективы использования активных фагов для обработки медицинских помещений с целью борьбы с внутрибольничными инфекциями.

Вследствие вышесказанного, поиск бактериофагов является весьма актуальным и определил цель настоящего исследования — поиск бактериофагов у полиантибиотикорезистентных штаммов клинически значимых возбудителей пневмоний, их биологическую и генетическую характеристику.

Материалы и методы

В работе использовали полиантибиотикорезистентные штаммы следующих видов: *Acinetobacter baumannii* — 8 шт., *Klebsiella pneumoniae* — 4 шт., *Stenotrophomonas maltophilia* — 2 шт., *Enterobacter cloacae* — 2 шт., *Chriseobacterium* — 1 шт., *Escherichia coli* — 1 шт., *Pseudomonas aeruginosa* — 7 шт., *Pseudomonas alcaligenes* — 1 шт., *Enterococcus spp.* — 2 шт., *Staphylococcus haemolyticus* — 4 шт. Все культуры выделены при исследовании клинических образцов мокроты от больных с пневмонией и любезно предоставлены старшим научным сотрудником ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» М.В. Цимбалистовой (табл. 1).

Чувствительность культур к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом. Результаты учитывали в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» [7].

Таблица 1

Маркеры устойчивости этиологически значимых возбудителей пневмоний

| Виды микроорганизмов | Количество штаммов | Ампициллин | Амоксициллин | Клафоран | Гентамицин | Амикацин | Доксидейлин | Азитромицин | Клиндамицин | Ципрофлоксацин | Левомецитин | Фуразолидон | Цефоперазон/сульбактам | Имипенем | Меропенем |
|-------------------------------------|--------------------|------------|--------------|----------|------------|----------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|------------------------|----------|-----------|
| <i>Escherichia coli</i> | 1 | R | R | R | R | R | R | S | R | S | R | S | - | - | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 4 | R | R | 3R 1S | 2R 2S | 1R 3S | R | 2R 2S | R | 3R 1S | 3R 1S | R | 3R 1S | 3R 1S | 3R 1S |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 8 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | 7R 1S | R | R |
| <i>Pseudomonas spp.</i> | 8 | R | R | 7R 1S | 5R 3S | 3R 5S | R | R | R | 2R 6S | R | R | 5R 3S | R | R |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 2 | R | R | R | 1R 1S | 1R 1S | R | R | R | 1R 1S | 1R 1S | R | 1R 1S | - | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 2 | R | R | R | S | R | R | R | R | S | S | R | - | - | - |
| <i>Chriseobacterium</i> | 1 | R | S | R | R | R | R | R | R | S | S | R | - | - | - |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 4 | R | R | R | R | 2R 2S | R | R | 1R 3S | R | 2R 2S | 3R 1S | - | - | - |
| <i>Enterococcus spp.</i> | 2 | S | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | - | - | - |

Примечание: «R» — устойчивые культуры; «S» — чувствительные культуры; «-» не определяли.

Штаммы и полученные индуцированные бактериофаги выращивали на 1,5% и 0,7% мясо-пептонном агаре и бульоне (рН 7,2).

Выделение бактериофагов из исследуемых культур проводили общепринятыми методами [1]. Для выделения бактериофагов применяли метод обнаружения фагов в надосадочной жидкости инактивированных хлороформом культур. В 4,5 мл МПБ засеивали 1 стандартную петлю суточной агаровой культуры исследуемого штамма и выращивали при 37 °С 24 часа. Затем добавляли 0,5 мл хлороформа, хорошо перемешивали и центрифугировали 3000 об/мин 20 минут. Надосадочную жидкость исследовали на наличие фага двухслойным методом по Грациа «дорожкой».

Первоначально индикаторами служили каждый из исследованных штаммов возбудителей пневмоний. Затем выделенные фаги размножали на штамме *P. aeruginosa* 45048, отобранном нами в процессе исследования.

Строение корпускул фага исследовали в электронном микроскопе Jeol JEM 1011. Препараты фага готовили из зоны фаголизиса, полученной на газоне культуры методом агаровых слоев. Суспензию бактериофага наносили на поверхность электронно-микроскопической сеточки, покрытой формваровой пленкой. Затем препарат наносили на пленку и осуществляли негативное контрастирование 2%-ным раствором уранилацетата 1 минуту. Приготовленные препараты исследовали в электронном микроскопе с увеличением в 200000 раз.

Выделение ДНК фагов проводили в соответствии с известными методами [3, 5]. Количество ДНК контролировали флуориметром QuantiFluor, качество – электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Отсутствие бактериальных хромосом в пробах подтверждали методом ПЦР. Раствор фаговой ДНК хранили при температуре -20 °С.

Геномная последовательность бактериофагов была определена с использованием одного из методов высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing). ДНК фагов секвенирована с помощью полногеномного секвенатора Miseq (Illumina).

Сравнение собранных геномов бактериофагов с аннотированными последовательностями известных бактериофагов проводили при помощи алгоритма BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Наличие или отсутствие генов, характерных для умеренных бактериофагов (генетических детерминант факторов антибиотикорезистентности, токсинов и интеграз) проверяли с помощью созданной нами базы данных и разработанного программного обеспечения под названием

«PhageAnalyzer» (<http://antiplague.ru/phageanalyzer/>) [9]. Прогнозирование функций белков осуществляли при помощи алгоритма программы BLASTX 2.12.0+ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты и обсуждение

В результате проведенной работы был подобран тест-штамм (*P. aeruginosa* 45048), обладающий хорошими индикаторными свойствами. Как установлено, из 32 клинических культур различных видов нам удалось выделить бактериофаги только из 2 культур – *P. aeruginosa* 45528 и 46115 (рис. 1).

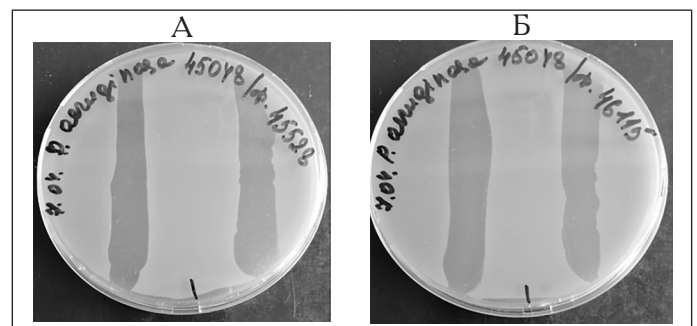


Рис. 1. Бактериофаги: (А) *P. aeruginosa* 45528; (Б) *P. aeruginosa* 46115

Маркеры антибиотикорезистентности штаммов *P. aeruginosa* (45528 и 46115) представлены в таблице 2.

Таблица 2

Маркеры устойчивости фаголизабельных штаммов *P. aeruginosa*

| Виды микроорганизмов | Ампициллин | Амоксилав | Клафоран | Гентамицин | Амикацин | Доксициклин | Азитромицин | Клиндамицин | Ципрофлоксацин | Левомецетин | Фуразолидон |
|-------------------------------------|------------|-----------|----------|------------|----------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 45528 | R | R | R | R | S | R | R | R | S | R | R |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 46115 | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R |

Примечание: «R» – устойчивые культуры; «S» – чувствительные культуры.

Фаги, селекционированные из изолированных колоний, подвергали трехкратному пассированию. Титр двух, выделенных нами, бактериофагов составлял $2 \cdot 10^8$ БОЕ/мл. Негативные колонии бактериофагов — мелкие, полупрозрачные, диаметром менее 1 мм.

По данным электронно-микроскопического исследования, псевдомонадный фаг 45528 имел полигональную головку размером 51×56 нм и длинный не сокращающийся хвост, размером 171 нм, а фаг *P. aeruginosa* 46115 имел полигональную головку размером 43×49 нм и длинный не сокращающийся хвост, размером 212 нм. Данные бактериофаги относятся к IV морфогруппе [12] и семейству *Siphoviridae* [13] (рис. 2).

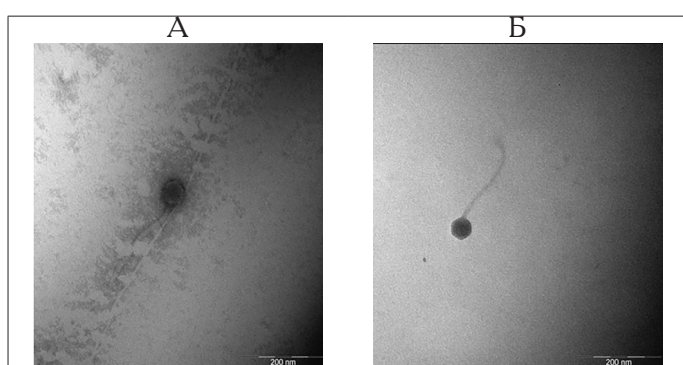


Рис. 2. Морфология бактериофагов: (А) *P. aeruginosa* 45528; (Б) *P. aeruginosa* 46115 (вид в электронном микроскопе Jeol JEM 1011, увеличение 200000)

Геномы фагов 46115 и 45528 состоят из 40103 и 40024 нуклеотидов с содержанием G+C 62,8 и 62,7% соответственно. В результате биоинформатического анализа при помощи программы PhageAnalyzer не было обнаружено известных детерминант устойчивости к антибиотикам и токсинов. В геномах исследованных бактериофагов обнаружены нуклеотидные последовательности, которые гомологичны на 97–98% фаговым интеграммам.

Результаты и обсуждение

Изучение включенной в исследование коллекции клинических штаммов выявило наличие у них разнообразных маркеров резистентности к антибактериальным препаратам (3 более).

Определение чувствительности 42 культур *P. aeruginosa* к полученным фагам показало узкий спектр их литической активности. В частности, бактериофаг *P. aeruginosa* 45528 лизировал только 8 культур из 42, а фаг 46115 лизировал 7 культур из 42, то есть литическая активность составила 19 и 16,7% соответственно.

В результате анализа системой BLASTN стало известно, что фаги 45528 и 46115 имеют перекрытие 99% и идентичность 100% (рис. 3). Выделенные из разных лизогенных штаммов *P. aeruginosa* бактериофаги оказались в наивысшей степени гомологичны друг другу.

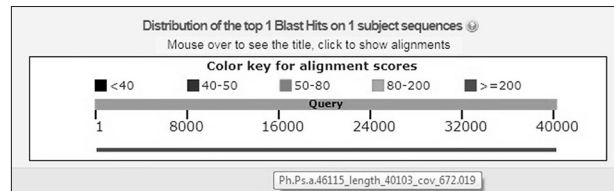


Рис. 3. Выравнивание ORF системой BLASTN для фагов 46115 и 45528

Геномы фагов 46115 и 45528 были проверены на гомологию нуклеотидной последовательности с последовательностями ДНК бактерий, бактериофагов и вирусов (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). После анализа обнаружено более 75 полных и частичных геномов бактериофагов, а также профагов *Pseudomonas* семейства *Siphoviridae* и *Myoviridae* порядка *Caudovirales*, имеющих процент перекрытия от 3 до 99% и идентичность от 76 до 100%. Наибольшей гомологией обладали 11 полных геномов бактериофагов *Pseudomonas* семейства *Siphoviridae* (рис. 4).

Как видно из рисунка 4, вычисленные системой BLAST попарные выравнивания между запросами исследованных фагов и последовательностями из известной базы данных оказались одинаковыми. Из этой группы *Pseudomonas phage* UMP151 имеет перекрытие 99% и идентичность 100% (GenBank: MK934841.1). Этот бактериофаг был выделен из штамма *P. aeruginosa*, полученного от пациента с гиперактивностью мочевого пузыря (ГМП). В нем найдены последовательности, гомологичные профагам, и литические ферменты [14].

По высокой степени гомологии с бактериофагами *Pseudomonas* можно установить, что исследованные нами фаги принадлежат к порядку *Caudovirales* семейства *Siphoviridae* (рис. 5). Эти данные подтверждают результаты электронной микроскопии.

При наличии геномных последовательностей для бактериофагов, требующих характеристики, одним из эффективных подходов является прогнозирование функции белков при обнаружении гомологии с белками, функции которых уже известны (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Результаты показали, что многие гены сходны с генами фагов и профагов семейства *Siphoviridae*, а также *Myoviridae* (рис. 6).

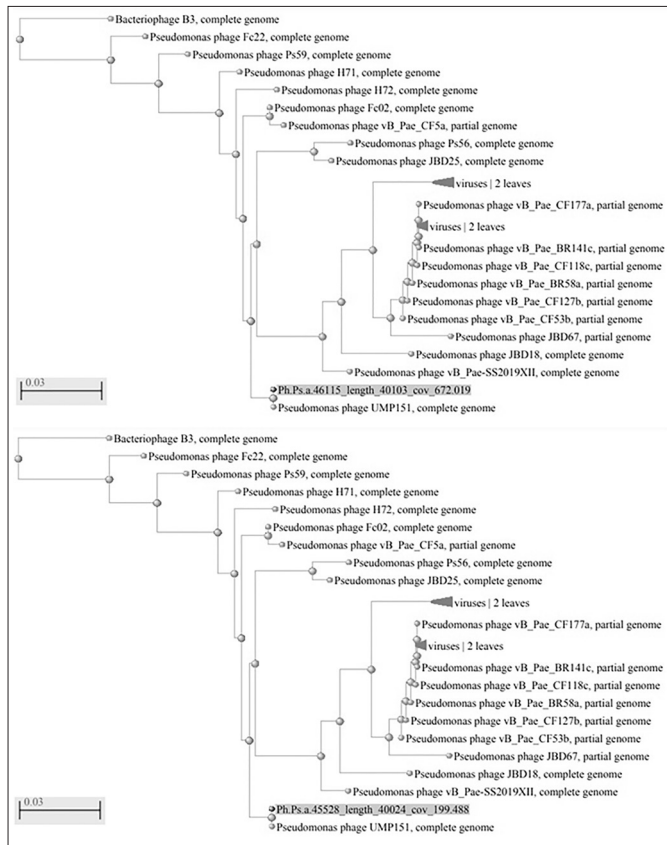


Рис. 4. Дендрограммы для бактериофагов №46115 и №45528

| Taxonomy | Number of hits | Number of Organisms |
|--|----------------|---------------------|
| ▣ Siphoviridae | 18 | 17 |
| ▣ unclassified Siphoviridae | 9 | 9 |
| . . Pseudomonas phage UMP151 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage Fc02 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage H72 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage H71 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage Ps59 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage vB_Pae_CF5a | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage Fc22 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage Ps56 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage JBD25 | 1 | 1 |
| ▣ Beatevirus | 9 | 8 |
| ▣ unclassified Beatevirus | 5 | 5 |
| . . Pseudomonas phage vB_Pae-SS2019XII | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage vB_Pae_BR141c | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage vB_Pae_CF177a | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage vB_Pae_CF125a | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage vB_Pae_CF78a | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage B3 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage JD18 | 1 | 1 |
| . . Pseudomonas phage JBD67 | 2 | 1 |

Рис. 5. Наиболее близкие представители *Pseudomonas phage*, предоставленные системой BLASTN

При помощи системы *BLASTX* обнаружены функциональные структурные белки вириона и хвоста; терминазы, характерные для *Pseudomonas phage* семейства *Siphoviridae*, а также терминазы семейства *Myoviridae* с идентичностью от 67 до 73%; бактерио-

протеин, идентичный на 96,66% (YP_009188564.1). Обнаружено, что гомологи транспозаз (11 последовательностей) были идентичны на 63–100% и интеграз (5 последовательностей) — идентичны на 62–98%.

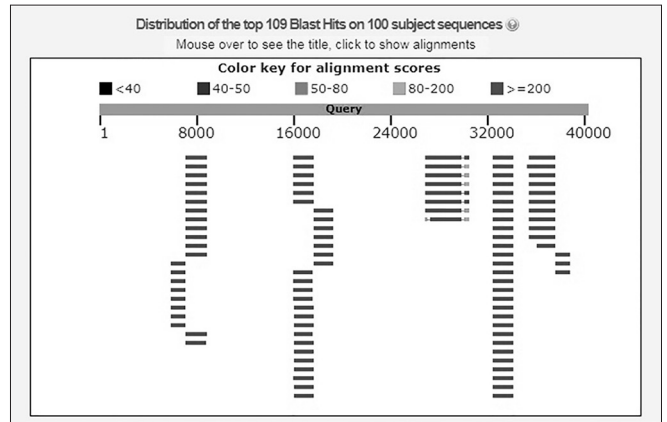


Рис. 6. Выравнивание ORF программой *BLASTX* 2.12.0+

Заключение

Таким образом, после проведения трансмиссионной электронной микроскопии было установлено, что все отобранные фаги являются головчатыми и принадлежат к порядку *Caudovirales*. Подтверждением этому могут служить данные по анализу нуклеотидных последовательностей, что позволяет отнести их к ДНК-содержащим хвостатым фагам. Бактериофаги *P. aeruginosa* 45528 и 46115 относятся к IV морфогруппе и семейству *Siphoviridae*.

Проведенное секвенирование и биоинформационный анализ двух выделенных фагов показали отсутствие генов антибиотикорезистентности и токсинов. В геномах исследованных бактериофагов обнаружены нуклеотидные последовательности, которые гомологичны на 97–98% фаговым интегразам. Присутствуют гомологи нуклеотидных последовательностей ДНК бактерий, профагов и фагов-транспозонов, что характеризует исследованные фаги как умеренные и в полной мере объясняет их узкий спектр литической активности (16,7–19%).

Изученная биологическая характеристика указанных фагов позволяет говорить о невозможности их использования в качестве лекарственных препаратов, но данные фаги могут быть использованы для изучения формирования саморегулирующихся устойчивых паразитарных экосистем «пациенты-бактерии-фаги». Перспективным направлением, на наш взгляд, является дальней-

шие исследования по получению вирулентных мутантов данных бактериофагов и поиск новых бактериофагов, активных в отношении полиантибиотикорезистентных штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций, которые в комплексе с другими антимикробными препаратами могут быть использованы для повышения эффективности этиотропной терапии инфекций.

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги / Пер. с англ. Т.С. Ильиной [и др.]; Под ред. и с предисл. канд. биол. наук А.С. Кривиского. — Москва : Изд-во иностр. лит., 1961. — 527 с.
2. Алеев И.А. Апокалипсис от ВОЗ бактерии, панрезистентные к антибиотикам, как реальная угроза человечеству. STATUSPRAESENS // Гинекология, акушерство, бесплодный брак. — 2012. — № 8(2). — С. 12–15.
3. Габрилович И.М. Практическое пособие по бактериофагии. — Минск: Вышэйшая школа, 1968.
4. Джиоев Ю.П., Злобин В.И., Саловарова В.П., Степаненко Л.А., Рева О.Н., Борисенко А.Ю. и др. Анализ проблемы «супербактерий» и современные подходы к ее решению // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. — 2019. — Т. 9. — № 4(31). — С. 665–678.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.
6. 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.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890-04. — М., 2004.
8. Орынбасарова К.К., Шаким Г.А., Есжанова Э.Д., Мусабекова Р.К., Сагимова Р.Ш., Абилядаев С.Т. и др. Применение пиобактериофага в комплексном лечении детей раннего возраста с внебольничной пневмонией (клиническое наблюдение) // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. — 2012. — Т. 10. — № 4. — С. 122–125.
9. Погужова М.П., Водопьянов А.С., Гаевская Н.Е., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П. PhageAnalyzer — программа для анализа данных полногеномного секвенирования бактериофагов. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2019616060 от 17.05.2019.

10. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Носков А.К., Ковалев Е.В., Карпущенко Г.В. и др. Особенности этиологии внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19 // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 4. — С. 99–105.
11. Стулова М.В., Кудряшева И.А., Полунина О.С., Черенова Л.П., Аршба Т.Е., Лисина О.А. и др. Сравнительный клинико-лабораторный анализ COVID-19 ассоциированной пневмонии с внебольничной пневмонией бактериальной этиологии // Современные проблемы науки и образования. — 2020. — № 3. — С. 134.
12. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. — М., 1968.
13. Ackerman H.B. Bacteriophage taxonomy in 1987 // Microbiol. Sci. — 1987. — Vol. 4(7). — P. 214–218.
14. Johnson G., Putonti C. Genome sequence of *Pseudomonas* phage UMP151, isolated from the female bladder microbiota // Microbiol. Resour. Announc. — 2019. — Vol. 8(33). — e00853–19. doi: 10.1128/MRA.00853-19.

References

1. Adams M. Bakteriofagi. Per s angl TS Il'inoi [i dr]; Pod red i s predisl kand biol nauk AS Kriviskogo. Moscow: Izd-vo inostr lit, 1961: 527 (in Russian).
2. Aleyev IA. Apokalipsis ot VOZ bakterii, panrezistentnyye k antibiotikam, kak real'naya ugroza chelovechestvu. STATUSPRAESENS. Ginekologiya, akusherstvo, besplodnyy brak 2012; 8(2):12–15 (in Russian).
3. Gabrilovich IM. Prakticheskoye posobiye po bakteriofagii. Minsk: Vysheyshaya shkola, 1968 (in Russian).
4. Dzhioyev YuP, Zlobin VI, Salovarova VP, Stepanenko LA, Reva ON, Borisenko AY i dr. Analiz problemy «superbakterii» i sovremennyye podkhody k yeye resheniyu. Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya 2019; 9(4):665–678 (in Russian).
5. Maniatis T, Frich E, Sembruk Dzh. Metody geneticheskoy inzhenerii: Molekulyarnoye klonirovaniye. Moscow: Mir, 1984 (in Russian).
6. Nesterova DD, Petrova AA, Luk'yanenko NV, Bobrovskiy YeA. Otsenka effektivnosti monitoringa chuvstvitel'nosti k dezinitsiruyushchim 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).
7. Opredeleniye chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: Metodicheskiye ukazaniya MUK 4.2.1890-04. Moscow, 2004 (in Russian).
8. Orynbasarova KK, Shakim GA, Yeszhanova ED, Musbekova RK, Sagimova RSh, Abil'dayev ST i dr. Primeneniye piobakteriofaga v kompleksnom lechenii detey rannego vozrasta s vnebol'nichnoy pnevmoniyey (klinicheskoye nablyudeniye).

- Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina 2012; 10(4):122–125 (in Russian).
9. Pogozhova MP, Vodop'yanov AS, Gayevskaya NYe, Pisanov RV, Vodop'yanov SO, Oleynikov IP. PhageAnalyzer — programma dlya analiza dannykh polnogenomnogo sekvenirovaniya bakteriofagov. Svidetel'stvo o gosudarstvennoy registratsii programmy dlya EVM № 2019616060 ot 17.05.2019 (in Russian).
 10. Popova AYu, Yezhlova YeB, Demina YuV, Noskov AK, Kovalev YeV, Karpushchenko GV i dr. Osobennosti etiologii vnebol'nichnykh pnevmoniy, assotsirovannykh s COVID-19. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 4:99–105 (in Russian).
 11. Stulova MV, Kudryasheva IA, Polunina OS, Cherenova LP, Arshba TYe, Lisina OA i dr. Sravnitel'nyy kliniko-laboratornyy analiz COVID-19 assotsirovannoy pnevmonii s vnebol'nichnoy pnevmoniyey bakterial'noy etiologii. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya 2020; 3:134 (in Russian).
 12. Tikhonenko AS. Ul'trastruktura virusov bakteriy. Moscow, 1968 (in Russian).
 13. Ackerman HB. Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol. Sci 1987; 4(7):214–218.
 14. Johnson G, Putonti C. Genome sequence of *Pseudomonas* phage UMP151, isolated from the female bladder microbiota. Microbiol. Resour. Announc 2019; 8(33):e00853–19. doi: 10.1128/MRA.00853-19.

STUDY OF BACTERIOPHAGES ISOLATED FROM POLYANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIAL STRAINS OF PNEUMONIA CAUSES IN CORONA-POSITIVE PATIENTS

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

Rostov-on-Don Order of the Red Banner of Labor Research Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Rostov-on-Don

The novel coronavirus disease COVID-19 is rightfully considered a major public health emergency. During the course of the disease, patients develop pneumonia, requiring hospitalization or progressing due to the addition of secondary complications of a bacterial or fungal nature. In most cases, complications are associated with the addition of polyantibiotic-resistant infectious agents. In this regard, the development of alternative methods of treating infections is one of the priority areas of modern medicine. In this work, we searched for and characterized bacteriophages isolated from polyantibiotic-resistant (having 3 or more resistance markers) clinically significant strains. Cultures of microorganisms were obtained from sputum samples from corona-positive patients with community-acquired pneumonia. The sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* cultures to various antibacterial drugs and bacteriophages obtained from *P. aeruginosa* (strains 45528 and 46115) was studied. It has been established that the phages studied by us belong to the order *Caudovirales* of the *Siphoviridae* family and belong to the IV morphogroup, which is confirmed by electron microscopic and molecular genetic studies. The sequencing and bioinformatic analysis of two isolated phages showed the absence of antibiotic resistance genes and toxins. In the genomes of the studied bacteriophages, nucleotide sequences were found that are 97–98% homologous to phage integrases. It was shown that these phages are moderate and cannot be used as therapeutic drugs, since they have a narrow spectrum of lytic activity (16.7–19%). A promising direction, in our opinion, is further research on obtaining virulent mutants of these bacteriophages and the search for new phages that are active against polyantibiotic-resistant strains of pathogens of nosocomial infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriophages, antibiotic resistance.

Address:

Gaevskaya N.E., Ph.D.

Leading researcher at the laboratory of bacteriophages, acting head of the diagnostic drugs department of the Rostov-on-Don order of the Red Banner of labor research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

Для цитирования:

Гаевская Н.Е., Аноприенко А.О., Погожова М.П., Тюрина А.В., Цимбалистова М.В. Изучение бактериофагов, выделенных из полиантибиотикорезистентных бактериальных штаммов возбудителей пневмоний у коронапозитивных больных. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3): 46–53.

For citation:

Gaevskaya N.E., Anoprienko A.O., Pogozhova M.P., Tyurina A.V., Tsimbalistova M.V. Study of bacteriophages isolated from polyantibiotic-resistant bacterial strains of pneumonia causes in corona-positive patients. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3):46–53 (in Russian).

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ *BACILLUS TOYONENSIS* В-13249 И *BACILLUS PUMILUS* В-13250

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

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул

Проведен подбор питательных сред для глубинного культивирования в условиях биореактора штаммов *Bacillus toyonensis* В-13249 и *B. pumilus* В-13250 из коллекции ИЦ «Промбиотех», выделенных из ризосферы растений Алтайского края и рекомендованных для использования в качестве основы микробиологических биопрепаратов. Оценена возможность культивирования на простых средах, широко используемых в микробиологии и биотехнологии для накопления культур в качалочных колбах. Выявлено, что такие среды слабо эффективны для выращивания микроорганизмов в промышленных биореакторах, так как на них не происходит накопление высокого титра бактерий, микроорганизмы по истечении 24 часов культивирования не выпадают в споры и себестоимость данных сред слишком высока. Проведены работы по оценке эффективности трех промышленных сред для использования их в ферментерах. На самой дешевой пшеничной среде оба штамма не набирают нужного титра и количества биомассы. При культивировании бактерий на меласно-кукурузной среде показатели промышленного культивирования выросли у *B. pumilus*, титры *B. toyonensis* уменьшились. При культивировании на меласно-кукурузной среде, обогащенной малым количеством пептона и дрожжевого экстракта, получены максимальные титры обоих микроорганизмов, с каждого цикла ферментации получено максимальное количество биомассы.

Ключевые слова: среда для культивирования, ферментация, пробиотики, микроорганизмы, *Bacillus pumilus*, *Bacillus toyonensis*.

Введение

Экономический эффект при производстве пробиотиков зависит от многих факторов, таких как: активность исходных культур по отношению к патогенам; способность культур наращивать высокий титр в производственных условиях; способность накапливать большое количество биомассы; биосовместимость микроорганизмов при производстве поликомпонентных продуктов; степень сохранности пробиотиков как в сухих, так и в жидких формах; условия хранения; способ введения пробиотика и др. В связи с вышеперечисленными факторами оптимизация технологий производства современных биологических препаратов постоянно развивается в различных направлениях: повышение эффективности культивирования микроорганизмов путем

подбора наиболее оптимальных физических и химических параметров [14, 18, 24]; выбор качественных и количественно выгодных питательных сред [2, 5, 23]; быстрое получение целевых биологически активных веществ: ферментов, аминокислот, витаминов и т.д. [1, 13, 20]; расширение пула штаммов микробов за счет поиска наиболее активных природных микроорганизмов [9–12, 16, 19].

При разработке биопрепаратов актуальной задачей является снижение их себестоимости за счет использования в качестве субстрата вторичных ресурсов переработки растительного сырья, например, отходов промышленного производства сахара, пива и т.д. [15, 17, 21, 22]. Среди других важных аспектов производства биопродуктов на основе микроорганизмов в промышленных масштабах можно выделить оптимизацию состава сред для культивирования, а также обогащение культуральной жидкости для накопления биомассы живых микроорганизмов или их метаболитов.

В качестве примера исследований по разработке условий производства и хранения биопрепарата в жидкой форме можно считать работу Сираевой Э.Ю. [7]. При подборе оптимального состава компонентов для культивирования микробов р. *Bacillus* экспериментально использовались следующие среды: меласная, пшенич-

© 2023 г. Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н., Ширманов М.В., Малкова А.В., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н.

* Автор для переписки:

Евдокимов Иван Юрьевич

исполняющий обязанности заместителя директора, младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета

E-mail: ivan.evdokimov.92@mail.ru

ная, картофельно-глюкозная, мелассно-кукурузная, пшенично-кукурузная с внесением кукурузного экстракта 1,0 г/л.

Другой группой ученых проведено обширное исследование по разработке оптимального состава среды для выращивания *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*. Показано влияние физических и химических факторов на параметры активности штаммов р. *Bacillus* в условиях твердофазного и глубинного культивирования. Выяснено, что наиболее оптимальной и экономически приемлемой стала среда на основе мелассы [2].

Еще одну работу по определению условий культивирования *Bacillus amyloliquefaciens* для получения целлюлазы провели ученые из Китая [24]. В ходе исследований были оптимально подобраны температура, время, значение рН при культивировании.

Вьетнамскими учеными определены условия культивирования и состав среды для производства глюкозоизомеразы из *Bacillus megaterium*: D-ксилоза (1,1%), K_2HPO_4 (0,2%), $MgSO_4 \times 7H_2O$ (0,1%), дрожжевой экстракт (1,2%), пептон (1%), рН 7,0, доля инокулята 20% (мас./об.), температура культивирования — 36,5 °С [18].

Работа по оптимизации среды культивирования путем добавления кукурузного экстракта и сахарозы при производстве фибринолитических ферментов с помощью *B. subtilis* WR350 проведена китайскими исследователями. Они разработали дешевую и простую среду (35 г/л сахарозы, 20 г/л кукурузного экстракта и 2 г/л $MgSO_4 \times 7H_2O$), а также оптимизировали параметры культивирования *B. subtilis* WR350 [23].

Российскими учеными предложен состав среды для повышения бактерицидной активности культуры *Bacillus thuringiensis* ssp. *dakota*. Основными факторами оптимизации у них были источники азота (пептон и дрожжевой экстракт) и углерода (глицерин и глюкоза). В результате подбора питательной среды представлен оптимальный количественный состав: пептон — 9 г/л; дрожжевой экстракт — 2,6 г/л; глицерин — 5,6 г/л [5].

Целью настоящего исследования являлась разработка качественного состава питательной среды для промышленного глубинного культивирования штаммов *Bacillus pumilus* В-13250 и *Bacillus toyonensis* В-13249.

Материалы и методы

Объектами данного исследования стали два штамма спорообразующих бактерий из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ: *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249.

Питательные среды, использованные в работе:

Твердая L(Лурия)-среда, г/л: пептон — 15,0; дрожжевой экстракт — 5,0; агар — 15,0; NaCl — 5,0; дистиллированная вода — до 1,0 л. Жидкая L-среда отличалась исключением агара из ее состава [6]. Глюкозо-пептонно-дрожжевая (далее — ГПД), г/л: глюкоза — 15; пептон — 3; дрожжевой экстракт — 5; K_2HPO_4 — 4; NaH_2PO_4 — 1; NaCl — 1; $CaCl_2$ — 1; $MgSO_4$ — 0,25; $MnSO_4$ — 0,03; $FeSO_4$ — 0,01; лапзол — 2; дистиллированная вода — до 1 л; рН 7,0 ± 0,1. Среда Эндо использовалась для проверки наличия/отсутствия в пробах энтеробактерий [8]. Криопротекторная среда, г/л: сахароза — 100; желатин — 25.

При подборе оптимальной для культивирования бактерий питательной среды в ферментационной установке в качестве экспериментальных использовали следующие:

- пшеничная (далее — ПС), г/л [7]: отруби пшеничные — 40; $MgSO_4$ — 0,9; KH_2PO_4 — 0,5; $CaCO_3$ — 1; дистиллированная вода — до 1 л; рН 7,0 ± 0,1;

- мелассно-кукурузная бедная (далее — МК-БС, собственная разработка), на основе интеграции данных других сред [4, 7], г/л: меласса — 25; кукурузный экстракт — 12,5; $MgSO_4$ — 0,9; KH_2PO_4 — 0,5; $CaCO_3$ — 1; лапзол — 0,25 мл; дистиллированная вода — до 1 л;

- мелассно-кукурузная обогащенная (далее — МК-ОС, доработанная [4]), г/л: меласса — 25; дрожжевой экстракт — 1; пептон — 0,5; кукурузный экстракт — 12,5; $MgSO_4$ — 0,25; $MnSO_4$ — 0,03; $CaCl_2$ — 1; $CoCl_2$ — 0,046; $FeSO_4$ и $CuSO_4$ — по 0,1 г; лапзол — 2 мл; дистиллированная вода — до 1 л.

В качестве главных критериев оценки уровня оптимизации питательной среды выбраны следующие: количество сухой биомассы (г), титр бацилл после 24 ч культивирования (КОЕ/мл) и титр высушенных спор и клеток исследуемых штаммов (КОЕ/г). Титр клеток определяли путем высева бактерий из соответствующего разведения на твердую L-среду.

Культуры глубинно засеивались петлей в колбы. Культивирование штаммов в колбах проводилось в шейкере-инкубаторе «Innova 44» (New Brunswick, США), при температуре 37 °С, со скоростью 250 об./мин, в течение 24 ч. Подсчет численности микроорганизмов и проверка на отсутствие контаминации в процессе культивирования осуществлялась путем поверхностного посева на твердую среду и дальнейшего термостатирования в BD 115 (Binder, Германия) при 37 °С, в течение 24 ч.

Для культивирования в ферментационной установке объемом 15 л (ООО «Сторге МК», г. Санкт-

Петербург) готовили питательную среду объемом не более 10 л. Приготовление и стерилизацию питательной среды осуществляли непосредственно в ферментёре. Предварительно аппарат стерилизовали вместе с воздушным фильтром при температуре 124 ± 2 °С в течение 1 часа. Все компоненты питательной среды поочередно подавали через приемник ферментёра. Доводили объём очищенной водой до 8 л. Значение рН, при необходимости, доводили до 6,8–7,0. Среду в аппарате нагревали до 115 °С путем подачи в рубашку ферментёра пара. Затем повышали температуру нагрева среды до 125 ± 1 °С путем подачи острого пара внутрь аппарата через барботер, пробоотборник и нижний слив. Продолжительность стерилизации составляла 1 ч. По завершении стерилизации подачу пара прекращали и питательную среду охлаждали до температуры 37 ± 1 °С путем подачи воды в теплообменник. При охлаждении среды воздушное давление поддерживали на уровне 0,03–0,05 МПа путем подачи стерильного воздуха в аппарат. Стерилизацию и охлаждение питательной среды проводили при непрерывном перемешивании (250 об./мин).

В процессе ферментации были установлены следующие параметры: объём среды с учетом набора конденсата — 10 литров; температура — 37 ± 1 °С; аэрация — 0,1 л/л/мин; скорость перемешивания среды — 250 об./мин; значение растворённого кислорода (ρ_{O_2}) — 100% от насыщения; давление в ферментёре 0,01–0,03 МПа; рН среды 6,8 поддерживали 20%-ным NaOH; в качестве пеногасителя использовали лапрол. Доза посевного материала составляла 10% от объема загружаемой среды в ферментёр. Перед посевом отбирали пробу среды для микробиологического контроля. Посев ферментёра материнской закваской проводили в стерильных условиях через посевной штуцер. Для проверки морфологического состояния культуры, а также присутствия (отсутствия) посторонней микрофлоры проводился стерильный отбор проб каждые 2 ч. Измерение оптической плотности (OD) культуры проводилось на спектрофотометре «UV-1280» (Shimadzu, Япония) при длине волны 490 нм. Процесс считался законченным, если концентрация клеток в споровой форме составляла 93–95%.

По окончании ферментации культуральную жидкость концентрировали на лабораторной центрифуге «4-16S/KS» (SIGMA, Япония). Полученный концентрат смешивали с криопротекторной средой, разливали в лотки и замораживали в морозильной камере при -20 °С в течение 24 ч.

Следующим этапом была лиофильная сушка. Для этого замороженную биомассу загружали на полку лио-

фильной сушки «Epsilon 1-4 LSCplus» (Martin Christ, Германия) и запускали процесс согласно инструкции по сушке биопродукта. По окончании лиофилизации биомассу извлекали, измельчали на бликсере и проверяли на остаточное содержание влаги с помощью анализатора влажности «МОС63u» (Shimadzu, Япония). В результате получали продукт влажностью не более 5%.

Для достоверности результатов все эксперименты проведены не менее чем в трех-пятикратной повторности. Однофакторный дисперсионный анализ (Statistica 13; MS Excel 2016) использовался для определения наличия значительных вариаций при подсчете разными методами. Данные в таблицах представлены как средние значения (M) со стандартным отклонением (m). Доверительный интервал различий между измерениями титров и масс концентратов вычислен при использовании коэффициента Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Для оценки экономического эффекта процесса была рассчитана стоимость каждой из используемых питательных сред на основании средних значений предоставленных цен из 3 коммерческих предложений, собранных в 2022 году. Также учитывалась стоимость воды на основании местного тарифа по г. Барнаул (Россия, Алтайский край) в период 2021–2022 гг. (табл. 1).

Таблица 1

Стоимость компонентов из всех использованных питательных сред (согласно данным, полученным в 2022 г.)

| Компонент среды | Стоимость, руб./кг (M±m) |
|----------------------------------|---|
| Дрожжевой экстракт | 1296,60±148,60 |
| Пептон | 4970,99±656,02 |
| NaCl | 134,00±1,00 |
| NaH ₂ PO ₄ | 491,68±173,45 |
| K ₂ HPO ₄ | 672,90±20,10 |
| MgSO ₄ | 207,91±1,00 |
| MnSO ₄ | 467,30±28,70 |
| CaCl ₂ | 223,68±69,36 |
| FeSO ₄ | 422,30±19,30 |
| Глюкоза | 477,93±105,00 |
| Меласса свекловичная | 79,55±5,30 |
| Кукурузный экстракт | 7,20±0,80 |
| CoCl ₂ | 4106,56±744,56 |
| CuSO ₄ | 552,27±21,04 |
| CaCO ₃ | 642,30±17,00 |
| Отруби пшеничные | 8,00±2,00 |
| KH ₂ PO ₄ | 648,33±114,33 |
| Пеногаситель — лапрол | 464,33±119,33 |
| Вода | 18,59 руб./куб.м = 0,019 руб./л ~ 0,02 руб./л |

Из приведенных данных видно, что самыми дорогими компонентами питательных сред являются источники азота — дрожжевой экстракт и пептон, широко используемые в микробиологических лабораторных исследованиях и служащие основой L-среды (табл. 2).

В качестве альтернативы для выращивания посевного материала была апробирована среда на основе пептона (в меньшем количестве) и дрожжевого экстракта, но с добавлением в качестве источника углеводов — глюкозы (ГПД). Стоимость такой среды практически втрое ниже L-среды (табл. 2). Однако титр при выращивании посевного материала на этих средах отличался. По истечении 24 часов роста штамм *B. pumilus* имел численность на

ГПД — $4,7 \pm 2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, на L-среде — $2,4 \pm 0,8 \times 10^9$ КОЕ/мл; *B. toyonensis* на ГПД — $4,6 \pm 2,0 \times 10^8$ КОЕ/мл, на L-среде — $5,9 \pm 1,6 \times 10^9$ КОЕ/мл. При суточном культивировании основная масса бактерий на L-среде и ГПД не образовывала споры, что также не оправдывает ферментационный процесс, где одним из критериев его окончания служил максимальный процент спорообразования. Таким образом, L-среда явилась благоприятной для выращивания посевного материала в колбах, так как на ней бактерии достигали до более высокого титра и сохранялся благоприятный уровень pH. Эти факторы намного сокращали лаг-фазу процесса дальнейшего культивирования [3].

Таблица 2

Состав и стоимость компонентов сред, используемых при глубинном культивировании в колбах

| L-среда (жидкая) | | ГПД среда | |
|--------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Компонент среды | Стоимость 1 л среды, руб. | Компонент среды | Стоимость 1 л среды, руб. |
| Дрожжевой экстракт | 6,35 | Дрожжевой экстракт | 6,35 |
| Пептон | 74,55 | Пептон | 14,91 |
| NaCl | 0,65 | NaCl | 0,13 |
| Вода | 0,02 | Вода | 0,02 |
| | | MgSO ₄ | 0,05 |
| | | MnSO ₄ | 0,01 |
| | | K ₂ HPO ₄ | 2,68 |
| | | CaCl ₂ | 0,22 |
| | | FeSO ₄ | 0,01 |
| | | Глюкоза | 7,20 |
| | | Лапрол | 0,92 |
| | | NaH ₂ PO ₄ | 0,49 |
| Итого | 81,57 | | 32,99 |

Исследование параметров глубинного культивирования в ферментационном аппарате проводили на трех средах разного состава: ПС, МК-БС, МК-ОС (табл. 3). В ходе исследований установлено, что во всех вариантах культивирования после посева инокулюмом ферментационного аппарата шло интенсивное потребление

питательных веществ из среды, понижение уровня растворенного кислорода и снижение уровня pH. Через 6–8 часов культивирования титрование щелочи заканчивалось, в это время происходило активное выделение метаболитов (белков, ферментов, аминокислот и др.) в среду, которое сопровождалось образованием пены.

Таблица 3

Состав и стоимость компонентов питательных сред, используемых при глубинном культивировании в ферментёре

| Пшеничная среда | | Мелассно-кукурузная бедная среда | | Мелассно-кукурузная обогащенная среда | |
|---------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Компонент среды | Стоимость 1 л среды, руб. | Компонент среды | Стоимость 1 л среды, руб. | Компонент среды | Стоимость 1 л среды, руб. |
| Отруби пшеничные | 0,40 | Меласса | 2,00 | Меласса | 2,00 |
| MgSO ₄ | 0,19 | Кукурузный экстракт | 0,13 | Кукурузный экстракт | 0,13 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,33 | MgSO ₄ | 0,19 | Дрожжевой экстракт | 1,27 |
| CaCO ₃ | 0,64 | KH ₂ PO ₄ | 0,33 | Пептон | 2,49 |
| Лапрол | 0,23 | CaCO ₃ | 0,64 | MgSO ₄ | 0,05 |
| Вода | 0,02 | Лапрол | 0,23 | MnSO ₄ | 0,01 |
| | | Вода | 0,02 | CoCl ₂ | 0,41 |
| | | | | CuSO ₄ | 0,04 |
| | | | | FeSO ₄ | 0,06 |
| | | | | Лапрол | 0,92 |
| | | | | Вода | 0,02 |
| Итого: | 1,81 | | 3,54 | | 7,40 |

После того как питательные компоненты среды заканчивались, происходило постепенное повышение уровня рН, что говорило о начале спорообразования. В этот период микроорганизмы активно поглощали кислород, и к 20–24 часам роста уровень pO_2 достигал отметки 50–100%, что подтверждало прекращение

дыхания и переход бактерий в споры. Дополнительным признаком окончания процесса ферментации являлись показания оптической плотности. По окончании роста оптическая плотность была максимальной или незначительно уменьшалась по сравнению с предыдущей пробой (табл. 4).

Таблица 4

Основные показатели при культивировании исследуемых штаммов

| Время, ч | Среда | $\rho_{HM} \pm m^*$ | | Оптическая плотность $M \pm m^*$ | |
|----------|-------|---------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|
| | | Штамм | | | |
| | | <i>B. pumilus</i> | <i>B. toyonensis</i> | <i>B. pumilus</i> | <i>B. toyonensis</i> |
| 0 | ПС | 6,88±0,15 | 6,69±0,01 | 0,351±0,014 | 0,311±0,015 |
| | МК-ОС | 6,81±0,01 | 6,92±0,04 | 0,490±0,021 | 0,490±0,002 |
| | МК-ОС | 6,63±0,16 | 6,88±0,11 | 0,639±0,030 | 0,531±0,019 |
| 2 | ПС | 6,82±0,02 | 6,80±0 | 0,387±0,012 | 0,340±0,010 |
| | МК-БС | 7,00±0,03 | 6,95±0,15 | 0,701±0,033 | 0,635±0,032 |
| | МК-ОС | 6,91±0,05 | 7,13±0,22 | 1,187±0,056 | 0,795±0,024 |
| 4 | ПС | 6,95±0,03 | 7,15±0,08 | 0,656±0,010 | 0,454±0,020 |
| | МК-БС | 7,33±0,07 | 6,96±0,15 | 1,183±0,041 | 0,764±0,027 |
| | МК-ОС | 7,21±0,31 | 8,06±0,15 | 1,706±0,081 | 1,464±0,013 |
| 6 | ПС | 7,10±0,10 | 7,31±0,02 | 0,845±0,015 | 0,686±0,032 |
| | МК-БС | 7,52±0,21 | 7,07±0,26 | 1,592±0,032 | 1,218±0,014 |
| | МК-ОС | 7,57±0,35 | 8,47±0,15 | 1,931±0,092 | 1,672±0,012 |
| 22–24 | ПС | 7,96±0,27 | 6,89±0,01 | 0,984±0,007 | 1,133±0,050 |
| | МК-БС | 8,47±0,15 | 8,31±0,11 | 2,284±0,051 | 1,713±0,070 |
| | МК-ОС | 7,89±0,19 | 8,48±0,21 | 2,400±0,085 | 2,042±0,042 |

Примечание: * – средние различия значимы при $p < 0,05$

В качестве прототипа пшеничной среды была использована среда, предложенная Э. Ю. Сираевой и др., которая зарекомендовала себя вполне эффективной при выращивании бактерий р. *Bacillus* [7]. Однако при ее использовании оказалось, что обе исследуемые культуры не набирали необходимого производственного титра ни в жидком виде, КОЕ/мл: *B. pumilus* – $2,44 \pm 0,11 \times 10^9$; *B. toyonensis* – $7,70 \pm 0,35 \times 10^8$, ни в высушенном, КОЕ/г: *B. pumilus* – $8,50 \pm 0,40 \times 10^{10}$; *B. toyonensis* – $6,50 \pm 0,32 \times 10^{10}$. Масса высушенных концентратов бацилл, как показано в таблице 5, тоже была низка: *B. pumilus* – $40,01 \pm 1,35$ г, *B. toyonensis* – $69,79 \pm 2,77$ г. Также стоит учитывать, что в производственных условиях обработка больших объемов отрубей, входящих в состав данной среды (варка, отжим, фильтрация), занимала дополнительное время. При культивировании же на МК-БС улучшились основные показатели. В частности, титр штамма *B. pumilus* увеличился в 1,6 раз и составил $3,89 \pm 0,14 \times 10^9$ КОЕ/мл, в то время как титр штамма *B. toyonensis*, наоборот, уменьшился, но не столь

значительно, и составил $7,20 \pm 0,30 \times 10^8$ КОЕ/мл. Такая же тенденция наблюдалась и в лиофильно высушенном виде: титр *B. pumilus* увеличился в 3,6 раза и составлял $3,10 \pm 0,12 \times 10^{11}$ КОЕ/г, титр *B. toyonensis* уменьшился до $4,00 \pm 0,10 \times 10^{10}$ КОЕ/г. Масса сухого концентрата *B. pumilus* составила – $62,99 \pm 3,15$ г, сухая биомасса *B. toyonensis* практически не изменилась и составила $69,70 \pm 2,55$ г. (см. табл. 5). Таким образом, использование пшеничной среды для глубинного культивирования изучаемых нами штаммов для промышленного производства не оправдано. Возможно, такая среда больше подходит для других штаммов рода *Bacillus*.

В качестве прототипа нашей МК-ОС были взяты варианты питательных сред из патента В.В. Джавахии и др. [4]. Для определения оптимального состава нами дополнительно проведен ряд экспериментов по подбору и замене некоторых компонентов среды. В качестве основы остались меласса и кукурузный экстракт, дополнительно добавлены источники азота и углеводов: пептон и дрожжевой экстракт, а также соли

(сульфаты, хлориды) в качестве источников макро- и микроэлементов. С изменением состава среды значительно улучшились основные показатели обоих штаммов при культивировании. Титр *B. pumilus* в жидком виде составил $8,30 \pm 0,36 \times 10^{10}$ КОЕ/мл, *B. toyonensis* — $2,50 \pm 0,12 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. В лиофильно высушенном титр *B. pumilus* — $5,80 \pm 0,25 \times 10^{11}$ КОЕ/г, что сравнимо с титром, полученным на МК-БС; культура же *B. toyonensis* имела титр стабильно нарастающий

до производственного — $3,60 \pm 0,05 \times 10^{11}$. Одной из главных положительных особенностей использования данной среды в качестве основной явилось накопление максимального количества биомассы по ходу процесса ферментации. Если обратить внимание на данные из таблицы 5, то количество высушенной биомассы *B. pumilus* и *B. toyonensis* — 134,39±6,36 г и 106,22±5,22 г соответственно, выше, чем в предыдущих экспериментах со средами.

Таблица 5

Показатели численности исследуемых штаммов

| Среда | Титр, после 24 ч культивирования (КОЕ/мл) (M±m)* | | Титр, после сушки (КОЕ/г) (M±m)* | | Количество сухой биомассы (г) (M±m)* | |
|-------|--|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| | <i>B. pumilus</i> | <i>B. toyonensis</i> | <i>B. pumilus</i> | <i>B. toyonensis</i> | <i>B. pumilus</i> | <i>B. toyonensis</i> |
| ПС | $2,44 \pm 0,11 \times 10^9$ | $7,70 \pm 0,35 \times 10^8$ | $8,50 \pm 0,40 \times 10^{10}$ | $6,50 \pm 0,32 \times 10^{10}$ | $40,01 \pm 1,35$ | $69,79 \pm 2,77$ |
| МК-БС | $3,89 \pm 0,14 \times 10^9$ | $7,20 \pm 0,30 \times 10^8$ | $3,10 \pm 0,12 \times 10^{11}$ | $4,00 \pm 0,10 \times 10^{10}$ | $62,99 \pm 3,15$ | $69,70 \pm 2,55$ |
| МК-ОС | $8,30 \pm 0,36 \times 10^{10}$ | $2,50 \pm 0,12 \times 10^{10}$ | $5,80 \pm 0,25 \times 10^{11}$ | $3,60 \pm 0,05 \times 10^{11}$ | $134,39 \pm 6,36$ | $106,22 \pm 5,22$ |

Примечание: * — средние различия значимы при $p < 0,05$

Из результатов исследования можно заключить, что на МК-ОС, при более высокой её стоимости, выход сухой биомассы *B. pumilus* на 70 и 53% выше, чем на ПС и МК-БС соответственно. Использование МК-ОС в качестве основной для штамма *B. toyonensis* также оправдано, поскольку количество сухой биомассы с одного цикла ферментации на 34% больше, чем на других средах. Таким образом, наиболее экономически выгодной питательной средой для глубинного культивирования в ферментёрах споровых бактерий, в частности штаммов *B. pumilus* В-13250 и *B. toyonensis* В-13249, является МК-ОС. Установлено, что добавление дрожжевого и кукурузного экстрактов, пептона, макро- и микроэлементов оказывает значительное влияние на рост и развитие бактерий.

Стоит отметить, что стоимость компонентов для питательных сред может сильно варьировать как в большую, так и меньшую сторону, что влияет на себестоимость. Это зависит от того, где и по каким ценам закупаются те или иные реактивы. Нужно также обращать внимание и на качество самих компонентов, ведь использование некачественных реагентов влечет за собой большие издержки в производстве.

Заключение

На основании проведенного исследования сделаны следующие выводы:

1. Использование L-среды и глюкозо-пептонно-дрожжевой среды (ГПД) для глубинного культивирования в ферментёре экономически не целесообразно, ввиду высокой стоимости основных компонентов.

2. Использование пшеничной среды (ПС) как самой дешёвой не выгодно, поскольку не происходит накопление оптимального количества клеток и биомассы.

3. Использование мелассно-кукурузной среды, обогащенной малым количеством пептона и дрожжевого экстракта (МК-ОС) для глубинного культивирования в ферментёре является оптимальным, так как происходит значительное увеличение титра и биомассы исследуемых микроорганизмов.

Литература

1. Беленькая С.В., Ельчанинов В.В., Щербаков Д.Н. Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis* // Биотехнология. — 2021. — Т. 37. — № 5. — С. 20–27.
2. 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 Иммунобиология Фармакология Санитария. — 2020. — Т. 2. — С. 3–12.
3. Гребенщикова А.В. Подбор условий культивирования для бактерий рода *Bacillus* // Труды молодых ученых

- Алтайского государственного университета: материалы VII региональной молодежной конференции «Мой выбор — НАУКА!». — 2020. — № 17. — С. 3–5.
4. Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Воинова Т.М., Карташов М.И., Овчинников А.И. Комбинированный пробиотический препарат на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* (варианты) для использования в животноводстве, способ его производства (варианты) и штамм *Bacillus subtilis* (natto), используемый в качестве добавки к препарату. Патент РФ. № 2675934. — 2018.
 5. Калмыкова Г.В., Чешкова 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.
 6. Малкова А.В., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Иркитова 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. С. 393–402.
 7. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Ильинская О.Н. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биофунгицида Бацизулин // Ученые записки казанского университета. Естественные науки. — 2010. — Т. 152. — № 4. — С. 169–178.
 8. Скоморина Ю.А., Кремлева А.А., Ахметова Л.Ш., Подольская Т.А., Шепелин А.П., Полосенко О.В. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических сред для выделения *Escherichia coli* с целью применения в ветеринарных лабораториях // Бактериология. — 2020. — Т. 5. — № 2. — С. 24–32.
 9. Chen J., Hub Sh., Jia D., Gao Zh., Wang H., Yanga Yo., Chena Yo., Gu J. Hemolysin BL from novel *Bacillus toyonensis* BV-17 induces antitumor activity both in vitro and in vivo // Gut microbes. — 2020. — Vol. 12. — No. 1. — e1782158. doi: 10.1080/19490976.2020.1782158.
 10. Contreras-Perez M., Salmeron J.H., Rojas-Solis D., Rocha-Granados C., Orozco-Mosqueda Ma.C., Parra-Cota F.I., Santos-Villalobos S.I., Santoyo G. Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. *Biloxi*) growth-promoting bacterium // 3 Biotech. — 2019. — Vol. 9. — Art. 370. doi: 10.1007/s13205-019-1911-5
 11. Giri S.S., Jun J.W., Yun S., Kim H.J., Kim S.G., Kang, Jeong W., Kim S.Wh., Han S.J., Park S.Ch., Sukumaran V. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from the gut of *Cyprinus carpio* that may be effective against lead toxicity // Probiotics and Antimicrobial Proteins. — 2019. — Vol. 11. — P. 65–73.
 12. Hage R.E., Hage J.E., Snini S.P., Ammoun I., Touma J., Rachid R., Mathieu F., Sabatier J.-M., Abi Khattar Z., Rayess Y. The detection of potential native probiotics *Lactobacillus* spp. against *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis* and *Salmonella Kentucky* ST198 of Lebanese chicken origin // Antibiotics. — 2022. — Vol. 11. — Art. 1147. doi: 10.3390/antibiotics11091147.
 13. Klausmann P., Hennemann K., Hoffmann M., Treinen C., Aschern M., Lilge, Lars H., Kambiz M., 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. — No. 10. — P. 4141–4151.
 14. Lao W.Ch., Toledo R.A., Shim H. Optimization of major environmental parameters to degrade scrap tyres by *Bacillus* sp. // Energy Procedia. — 2018. — Vol. 153. — P. 226–230.
 15. Magarelli R.A., Trupo M., Ambrico A., Larocca V., Martino M., Palazzo S., Balducchi R., Joutsjoki V., Pihlanto A., Bevivino A. Designing a waste-based culture medium for the production of plant growth promoting microorganisms based on cladodes juice from *Opuntia ficus-indica* pruning // Fermentation. — 2022. — Vol. 8. — Art. 225. doi: 10.3390/fermentation8050225.
 16. Naiel M.A.E., Shehata A.M., El-Kholy A.I., El-Naggar K., Farag M.R., Alagawany M. The mitigating role of probiotics against the adverse effects of suboptimal temperature in farmed fish: A review // Aquaculture. — 2022. — Vol. 550. — Art. 737877. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737877.
 17. Nemr R.A., Patz S., Abdelwakeel S.M., Khalil M., Ben Djadid A., Abdelfadeel M.R., Morsi A.T., Goda H.A., Youssef H.H., Hamza M., Abbas M., Fayez M., El-Sahhar K.F., Becker M., Ruppel S., Hegazi N.A. Culture media based on leaf strips/root segments create compatible host/organ setup for in vitro cultivation of plant microbiota // Frontiers in Sustainable Food Systems. — 2021. — Vol. 5. — Art. 660790. doi: 10.3389/fsufs.2021.660790.
 18. Nguyen H.-Y.Th., Tran G.-B. Optimization of fermentation conditions and media for production of glucose isomerase from *Bacillus megaterium* using response surface methodology // Hindawi Scientifica. — 2018. — Art. 6842843. doi: 10.1155/2018/6842843.
 19. Ramlucken U., Laloo R., Roets Y., Moonsamy G., Rensburg C.J., Thantsha M.S. Advantages of *Bacillus*-based probiotics in poultry production // Livestock Science. — 2020. — Vol. 241. — Art. 104215. doi: 10.1016/j.livsci.2020.104215.
 20. Shahzadi I., Al-Ghamdi M.A., Nadeem M.Sh., Sajjad M., Ali A., Khan J.A., Kazmi I. Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum* // Scientific Reports. — 2021. — Vol. 11. — Art. 7145. doi: 10.1038/s41598-021-86000-z.
 21. Subbairya R., Aakash B., Shanmugaraja A., Devika R., Chozhavendhan S., Vinoth S., Devi G.K., Selvam M.M. Vegetable waste as an alternate plant tissue culture media for laboratory and industry // Research Journal of Pharmacy and Technology. — 2019. — Vol. 12. — No. 4. — P. 1521–1528.

22. Watthanasakphuban N., Nguyen L.V., Cheng Y.-S., Show P.-L., Sriariyanun M., Koffas M., Rattanaporn K. Development of a molasses-based medium for *Agrobacterium tumefaciens* fermentation for application in plant-based recombinant protein production // *Fermentation*. — 2023. — Vol. 9. — Art. 149. doi: 10.3390/fermentation9020149.
 23. 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. — Art. 6824. doi: 10.1038/s41598-019-43371-8.
 24. Ye M., Sun L., Yang R., Wang Z., Qi K.Z. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed // *Royal Society Open Science*. — 2017. — Vol. 4. — Art. 171012. doi: 10.1098/rsos.171012.
- References**
1. Belen'kaya SV, Yel'chaninov VV, Shcherbakov DN. Razrabotka produktov rekombinantnogo khimozina marala na osnove drozhzhey *Kluyveromyces lactis*. *Biotekhnologiya* 2021; 37(5):20–27 (in Russian).
 2. Borisovets DS, Zhuravleva YeS, Zuykevich TA, Krasochko PA, Yaromchik YaP, Morozov AM, Kurbat IA. Optimizatsiya sostava sredy dlya kul'tivirovaniya shtammov bakteriy roda *Bacillus*, vydelennykh iz donnykh otlozheniy presnovodnykh vodoyemov. *Epizootologiya Immunobiologiya Farmakologiya Sanitariya* 2020; 2:3–12 (in Russian).
 3. Grebenshchikova AV. Podbor usloviy kul'tivirovaniya dlya bakteriy roda *Bacillus*. *Trudy molodykh uchenykh Altayskogo gosudarstvennogo universiteta: materialy VII regional'noy molodezhnoy konferentsii «Moy vybor — NAUKA!»* 2020; 17:3–5 (in Russian).
 4. Dzhavakhiya VV, Glagoleva YeV, Voinova TM, Kartashov MI, Ovchinnikov AI. Kombinirovannyi probioticheskiy preparat na osnove sporoobrazuyushchikh bakteriy roda *Bacillus* (varianty) dlya ispol'zovaniya v zhivotnovodstve, sposob yego proizvodstva (varianty) i shtamm *Bacillus subtilis* (natto), ispol'zuyemyy v kachestve dobavki k preparatu. *Patent RF*. № 2675934 2018 (in Russian).
 5. 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).
 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). S. 393–402 (in Russian).
 7. Sirayeva ZYu, Zakharova NG, Il'inskaya ON. Tekhnologiya polucheniya i otsenka stabil'nosti pri khraneni zhidkoy preparativnoy formy biofungitsida Batsizulin. *Uchenyye zapiski kazanskogo universiteta. Yestestvennyye nauki* 2010; 152(4):169–178 (in Russian).
 8. Skomorina YuA, Kremleva AA, Akhmetova LSh, Podol'skaya TA, Shepelin AP, Polosenko OV. Sravnitel'naya otsenka differentsial'no-diagnosticskikh sred dlya vydeleniya *Escherichia coli* s tsel'yu primeneniya v veterinarnykh laboratoriyakh. *Bakteriologiya* 2020; 5(2):24–32 (in Russian).
 9. Chen J, Hub Sh, Jia D, Gao Zh, Wang H, Yanga Yo, Chena Yo, Gu J. Hemolysin BL from novel *Bacillus toyonensis* BV-17 induces antitumor activity both in vitro and in vivo. *Gut microbes* 2020; 12(1):e1782158. doi: 10.1080/19490976.2020.1782158.
 10. Contreras-Perez M, Salmeron JH, Rojas-Solis D, Rocha-Granados C, Orozco-Mosqueda MaC, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos SI, Santoyo G. Draft genome analysis of the endophyte, *Bacillus toyonensis* COPE52, a blueberry (*Vaccinium* spp. var. *Biloxi*) growth-promoting bacterium. *3 Biotech* 2019; 9:370. doi: 10.1007/s13205-019-1911-5
 11. Giri SS, Jun JW, Yun S, Kim HJ, Kim SG, Kang, Jeong W, Kim SWH, Han SJ, Park SCh, Sukumaran V. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from the gut of *Cyprinus carpio* that may be effective against lead toxicity. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2019; 11:65–73.
 12. Hage RE, Hage JE, Snini SP, Ammoun I, Touma J, Rachid R, Mathieu F, Sabatier J-M, Abi Khattar Z, Rayess Y. The detection of potential native probiotics *Lactobacillus* spp. against *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis* and *Salmonella Kentucky* ST198 of Lebanese chicken origin. *Antibiotics* 2022; 11:1147. doi: 10.3390/antibiotics11091147.
 13. Klausmann P, Hennemann K, Hoffmann M, Treinen C, Aschern M, Lilge, Lars H, Kambiz M, 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.
 14. Lao WCh, Toledo RA, Shim H. Optimization of major environmental parameters to degrade scrap tyres by *Bacillus* sp. *Energy Procedia* 2018; 153:226–230.
 15. Magarelli RA, Trupo M, Ambrico A, Larocca V, Martino M, Palazzo S, Balducchi R, Joutsjoki V, Pihlanto A, Bevivino A. Designing a waste-based culture medium for the production of plant growth promoting microorganisms based on cladodes juice from *Opuntia ficus-indica* pruning. *Fermentation* 2022; 8:225. doi: 10.3390/fermentation8050225.
 16. Naiel MAE, Shehata AM, El-Kholy AI, El-Naggar K, Farag MR, Alagawany M. The mitigating role of probiotics against the adverse effects of suboptimal temperature in farmed fish: A review. *Aquaculture* 2022; 550:737877. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737877.
 17. Nemr RA, Patz S, Abdelwakeel SM, Khalil M, Ben Djadid A, Abdelfadeel MR, Morsi AT, Goda HA, Youssef HH, Hamza M, Abbas M, Fayez M, El-Sahhar KF, Becker M, Ruppel S, Hegazi NA. Culture media based on leaf strips/root segments create compatible host/organ setup

- for in vitro cultivation of plant microbiota. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2021; 5:660790. doi: 10.3389/fsufs.2021.660790.
18. Nguyen H-YTh, Tran G-B. Optimization of fermentation conditions and media for production of glucose isomerase from *Bacillus megaterium* using response surface methodology. *Hindawi Scientifica* 2018;6842843. doi: 10.1155/2018/6842843.
 19. Ramlucken U, Laloo R, Roets Y, Moonsamy G, Rensburg CJ, Thantsha MS. Advantages of *Bacillus*-based probiotics in poultry production. *Livestock Science* 2020; 241:104215. doi: 10.1016/j.livsci.2020.104215.
 20. Shahzadi I, Al-Ghamdi MA, Nadeem MSh, Sajjad M, Ali A, Khan JA, Kazmi I. Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Scientific Reports* 2021; 11:7145. doi: 10.1038/s41598-021-86000-z.
 21. Subbaiya R, Aakash B, Shanmugaraja A, Devika R, Chozhavendhan S, Vinoth S, Devi GK, Selvam MM. Vegetable waste as an alternate plant tissue culture media for laboratory and industry. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 2019; 12(4):1521–1528.
 22. Watthanasakphuban N, Nguyen LV, Cheng Y-S, Show P-L, Sriariyanun M, Koffas M, Rattanaporn K. Development of a molasses-based medium for *Agrobacterium tumefaciens* fermentation for application in plant-based recombinant protein production. *Fermentation* 2023; 9:149. doi: 10.3390/fermentation9020149.
 23. 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; 9:6824. doi: 10.1038/s41598-019-43371-8.
 24. Ye M, Sun L, Yang R, Wang Z, Qi KZ. The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed. *Royal Society Open Science* 2017; 4:171012. doi: 10.1098/rsos.171012.

CHOICE OF THE OPTIMAL NUTRIENT MEDIUM FOR SUBMERGED CULTIVATION OF NATURAL STRAINS OF *BACILLUS TOYONENSIS* B-13249 AND *BACILLUS PUMILUS* B-13250

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

Altai State University, Barnaul, Russia

The selection of nutrient media for submerged cultivation in bioreactor conditions of *Bacillus toyonensis* B-13249 and *B. pumilus* B-13250 strains from the collection of the Research Center «Prombiotech», isolated from the rhizosphere of plants of the Altai Territory and recommended for use as the basis of microbiological biological preparations, was carried out. The possibility of cultivation on simple media, widely used in microbiology and biotechnology for the accumulation of cultures in shake flasks, was evaluated. It was found that such media are poorly effective for growing microorganisms in industrial bioreactors, since they do not accumulate a high titer of bacteria, microorganisms do not fall into spores after 24 hours of cultivation, and the cost of these media is too high. Work has been carried out to evaluate the effectiveness of three industrial media for their use in fermenters. On the cheapest wheat medium, both strains do not gain the required titer and amount of biomass. When cultivating bacteria on a molasses-corn medium, the indicators of industrial cultivation increased in *B. pumilus*, while the titers of *B. toyonensis* decreased. When cultivating on a molasses-corn medium enriched with a small amount of peptone and yeast extract, the maximum titers of both microorganisms were obtained, and the maximum amount of biomass was obtained from each fermentation cycle.

Keywords: culture medium; fermentation; probiotics; microorganisms; *Bacillus pumilus*; *Bacillus toyonensis*.

Address:

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

Для цитирования:

Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н., Ширманов М.В., Малкова А.В., Дудник Д.Е., Каргашилова Е.Н. Выбор оптимальной питательной среды для глубинного культивирования природных штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3):54–63.

For citation:

Evdokimov I.Yu., Irkitova A.N., Shirmanov M.V., Malkova A.V., Dudnik D.E., Kargashilova E.N. Choice of the optimal nutrient medium for submerged cultivation of natural strains of *Bacillus toyonensis* B-13249 and *Bacillus pumilus* B-13250. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3):54–63 (in Russian).

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ С ЗЕРНОВЫМ МИЦЕЛИЕМ ВЁШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ИЗУЧЕННОЕ У ТЕЛЯТ

С.В. ПОЛЬСКИХ*, В.А. ГРЫЗЛОВ, А.А. ИВАНОВ

Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I, Воронеж

Цель работы состоит в определении влияния пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной на гематологические и биохимические показатели телят. Для достижения поставленной цели проведено исследование на двух группах телят, в каждой из которых было по 20 голов. Животные из контрольной группы к своему основному рациону дополнительно получали еще по 1 кг в сутки кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной. В результате исследования установлено, что включение в рацион телят 2–3-месячного возраста 1 кг пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной повлияло на увеличение количества эритроцитов и лейкоцитов — на 9,4%, 6,9% соответственно. На 20-й день опыта отмечено повышение гемоглобина на 8,3%. Также установлено, что уровень глюкозы в крови телят, рацион которых был обогащен добавкой, характеризовался стабильностью по сравнению с контрольной группой телят, а уровень холестерина в крови был ниже на 18–24%. Кроме того, среднесуточный прирост массы телят в результате опыта составил 14,8% по отношению к контролю. Следовательно, можно отметить, что применение пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной способно оказывать стимулирующее влияние на окислительно-восстановительные и обменные процессы, а также повышать интенсивность протекания метаболических реакций и ферментативную активность в организме телят. Проведенное исследование имеет практическое значение для животноводства и сельского хозяйства в целом, так как полученные результаты могут быть использованы для оптимизации кормления телят и повышения продуктивности животноводства.

Ключевые слова: пробиотики, скотоводство, телята, корма, сыворотка крови, рацион, прирост массы, общий белок, гемоглобин, биохимия крови, крупный рогатый скот.

Введение

Пробиотические кормовые добавки могут положительно влиять на здоровье, пищеварение и хозяйственное применение крупного рогатого скота (КРС), в том числе телят. В животноводстве использование пробиотических кормовых добавок способствует улучшению работы желудочно-кишечного тракта, повышению иммунитета и снижению риска заболеваний у КРС. Кроме того, применение пробиотиков может снижать затраты на ветеринарное лечение, что является экономически выгодным для животноводов.

Однако не все пробиотические добавки одинаково эффективны, и их влияние на здоровье животных может зависеть от многих факторов, например, таких как их

состав, дозировка и применение в конкретных условиях. Поэтому необходимо проводить дополнительные исследования для оценки их эффективности.

Многие исследования, оценивающие влияние пробиотических кормовых добавок на гематологические и биохимические показатели телят, проводились с использованием различных пробиотических добавок и методов оценки эффектов [1, 3, 4]. Одним из возможных вариантов может быть использование кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной.

Согласно исследованиям А.И. Козинец, такая добавка может улучшать пищеварение, увеличивать прирост и снижать заболеваемость телят, что может свидетельствовать о положительном влиянии на процессы обмена [2].

Исследование А. Molitorisová показало, что добавление экстракта Вёшенки обыкновенной в корм телятам способствовало увеличению уровня гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в крови животных [18]. Также отмечалось улучшение биохимических показателей крови, таких как уровень белка и аминокислот, что мо-

© 2023 г. Польских С.В., Грызлов В.А., Иванов А.А.

* Автор для переписки:

Польских Светлана Валерьевна

к.б.н., доцент кафедры частной зоотехнии, Воронежский ГАУ им. Императора Петра I

E-mail: s-polskikh5958@rambler.ru

жет указывать на улучшение пищеварения и абсорбции питательных веществ [5–7].

D. Roy [19] отмечал позитивные эффекты от применения пробиотиков. Имеются данные, что пробиотические добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной могут улучшать иммунную систему телят, снижать уровень холестерина в крови и нормализовать состояние кишечника, что может способствовать росту и развитию животных [8, 10, 11].

Изучение влияния пробиотических кормовых добавок на здоровье КРС имеет большое значение для животноводства, так как заболевания и низкая продуктивность животных могут приводить к экономическим потерям для фермеров [9, 12, 16, 20].

Использование зернового мицелия Вёшенки обыкновенной может быть более экологически и социально ответственным выбором, так как способствует утилизации сельскохозяйственных отходов и снижению использования антибиотиков в животноводстве. Кроме того, использование такой добавки может способствовать снижению затрат на ветеринарное лечение и повышению экономической эффективности животноводства.

Цель работы — определить влияние пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной на гематологические и биохимические показатели телят. Для достижения цели решались следующие задачи: 1) исследовать значения гематологических и биохимических показателей крови телят; 2) определить прирост массы телят; 3) дать рекомендации по добавлению кормовой добавки на основе зернового мицелия Вёшенки обыкновенной в рацион телят.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе ФГБОУ ВО Воронежского ГАУ им. Императора I, г. Воронеж, а также на базе ФГБОУ ВО Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, г. Краснодар. Исследование осуществлялось на животных из КФХ Фомин Липецкой области. с. Добринка.

Телята в возрасте 2–3 месяцев были распределены на 2 группы (контрольная и опытная), в каждой из которых было по 20 животных. Телята контрольной группы получали основной рацион — он приведен в таблице 1. Животные опытной группы получали дополнительно еще по 1 кг в сутки кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной. Живую массу телят определяли согласно данным ежемесячных взвешиваний.

Таблица 1

Состав основного суточного рациона кормления телят

| Состав основного рациона | В рационе содержится, % |
|-------------------------------|-------------------------|
| экструдированное зерно ячменя | 41 |
| экструдированная кукуруза | 17,5 |
| соевый шрот | 16 |
| дроблёная пшеница | 14 |
| кормовые дрожжи | 5 |
| сухое молоко | 5 |
| поваренная соль и премикс | 1,5 |

Для изучения гематологических и биохимических показателей проводили забор крови из яремной вены. Кровь брали в утренние часы за 1 час до дачи кормов и воды у 5 голов с каждой из групп животных через 20, 40 и 60 дней от начала опыта.

Проводили изучение гематологических и биохимических показателей по общепринятым методикам: содержание гемоглобина определяли при помощи колориметрического метода на СФ-103, количественное содержание лейкоцитов и эритроцитов в крови — в камере Горяева. Кроме того, в сыворотке крови определяли содержание общего белка и его отдельных фракций: альбуминов и глобулинов, а также содержание глюкозы и холестерина при помощи автоанализатора «Cormay Lumen (BTS 370 Plus)» (Страна-производитель, Испания).

Все эксперименты повторялись трижды для каждого варианта опыта. Обработку полученных результатов исследований на достоверность осуществляли многофакторным методом дисперсионного анализа MANOVA с использованием программного обеспечения Microsoft Excel и пакета программ Statistica 10. Различия полученных результатов возможны при уровне значимости $p \leq 0,05$ по критерию Стьюдента.

Необходимо подчеркнуть, что клинический анализ крови для измерения гематологических параметров является важным инструментом для оценки здоровья телят и может помочь выявить различные заболевания и состояния, такие как анемия, инфекции и воспаление. Эти данные могут быть использованы для определения эффективности действия пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной на гематологические показатели животных [14, 15, 17]. Уровень глюкозы в крови может отражать наличие диабета, а уровень белка может указывать на проблемы с питанием или почечной функцией. Уровень определенных ферментов может свидетельствовать о повреждении тканей или

о наличии определенных заболеваний, таких как гепатит или панкреатит [13].

Биохимические характеристики крови могут быть использованы для совершенствования рационов животных. Также биохимические анализы крови могут помочь в определении оптимальной дозировки лекарственных препаратов для животных, так как они могут указать на уровень ферментов, ответственных за метаболизм лекарственных веществ [1, 18].

Результаты

В проведенном исследовании установлено, что добавление в рацион телят пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной оказывает определенное влияние на изучаемые показатели крови у телят.

Так, количество эритроцитов и лейкоцитов в крови животных опытной группы незначительно, но увеличивалось по мере возрастания срока проведения опыта (табл. 2). На 40-й день в крови телят опытной группы содержание эритроцитов на 8,1% превышало показатели телят контрольной группы, на 60-й день — уже на

9,4%, а количество лейкоцитов — соответственно на 6,1 и 6,9%. Более высокое содержание эритроцитов может характеризовать повышение окислительной активности крови и метаболизма телят.

Количество гемоглобина после скармливания добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной также было выше у телят опытной группы, что может свидетельствовать о более высокой активности обменных процессов в животных. В ходе исследования установлено, что на 20-й день в крови телят опытной группы отмечено повышение гемоглобина на 8,3%.

Увеличение количества эритроцитов и уровня гемоглобина в крови телят может свидетельствовать о повышении кислородтранспортной способности крови и улучшении общего здоровья животных. Важно отметить, что изменение морфологических показателей в крови животных на фоне применения добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной было в пределах физиологических норм.

Установлено, что на 40-й день исследования уровень общего белка в крови животных опытной группы на 3,8% превышал показатели контрольной группы, а на конец исследования — на 4,8%.

Таблица 2

Количественные показатели крови телят

| Показатели | Группы животных | | | | | |
|-------------------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | I контрольная | | | II опытная | | |
| | 20-й день | 40-й день | 60-й день | 20-й день | 40-й день | 60-й день |
| Лейкоциты, $10^{12}/л$ | 8,12±4,13 | 8,19±3,05 | 8,21±2,64 | 8,56±2,12 | 8,69±2,01 | 8,78±3,43 |
| Эритроциты, $10^{12}/л$ | 5,24±2,83 | 5,67±4,03 | 5,73±1,53 | 6,01±4,56 | 6,13±1,93 | 6,27±2,46 |
| Общий белок, г/л | 76,8±1,28 | 81,3±3,023 | 82,9±2,78 | 77,5±2,84 | 84,4±2,73 | 86,9±2,93 |
| Альбумины, г/л | 39,4±2,09 | 39,8±2,98 | 40,2±2,36 | 39,8±1,53 | 40,1±4,41 | 41,2±2,48 |
| Глобулины, г/л | 29,4±2,45 | 30,2±4,13 | 31,4±2,07 | 30,5±2,46 | 33,1±3,48 | 33,8±4,69 |
| Гемоглобин, г/л | 102,4±3,01 | 102,8±3,82 | 103,1±2,93 | 110,9±1,09 | 111,6±2,46 | 112,1±4,13 |
| Холестерин, ммоль/л | 3,42±3,54 | 3,39±1,36 | 3,46±4,13 | 2,96±2,47 | 2,79±4,42 | 2,61±1,09 |
| Глюкоза, ммоль/л | 4,87±4,21 | 4,91±2,78 | 4,82±3,46 | 4,28±4,13 | 4,27±1,23 | 4,26±2,25 |

Повышение уровня общего белка в основном происходило за счет его отдельных фракций, а именно: альбуминов и глобулинов. Альбумины и глобулины могут влиять на ферментативную активность в сыворотке крови. Например, альбумин может связывать и транспортировать некоторые ферменты — щелочную фосфатазу и аминотрансферазы. Глобулины, в свою очередь, могут содержать ферменты, такие как ферритин и трансферрин,

которые участвуют в транспортировке железа и других металлов в организме [20].

В исследовании установлено, что у телят, которым давали пробиотическую кормовую добавку с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной, уровень глюкозы в крови был стабильнее по сравнению с контрольной группой телят, которых кормили стандартным рационом без этой добавки. Это объясняется тем, что Вёшенка обыкновенная

новенная содержит полисахариды, которые могут помочь регулировать уровень глюкозы в крови благодаря своему способу воздействия на обмен веществ у животных.

В работе также было найдено, что у телят, которым давали пробиотическую кормовую добавку с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной, уровень холестерина в крови на 18–24% был ниже по сравнению с контрольной группой животных. Это можно объяснить тем, что Вёшенка обыкновенная содержит еще и бета-глюканы, которые могут связываться с холестерином в кишечнике и помогать его выводу из организма. Также эти вещества могут влиять на улучшение метаболизма липидов и жиров в организме, что может способствовать снижению уровня холестерина в крови.

Полученные данные динамики роста животных свидетельствуют о том, что добавление в их основной рацион кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной положительно влияло на изменение живой массы. По результатам ежемесячных взвешиваний, телята опытной группы более интенсивно росли, чем животные, в рационе которых отсутствовала добавка с Вёшенкой обыкновенной. Прирост массы телят опытной группы уже на 20-е сутки на 8,5% превышал прирост массы телят из контрольной группы (рис. 1).

Кроме того, установлено, что среднесуточный прирост массы животных в соотношении опытная / контрольная группа составил 14,8%, а валовый прирост телят опытной группы – 64,4 кг (табл. 3).

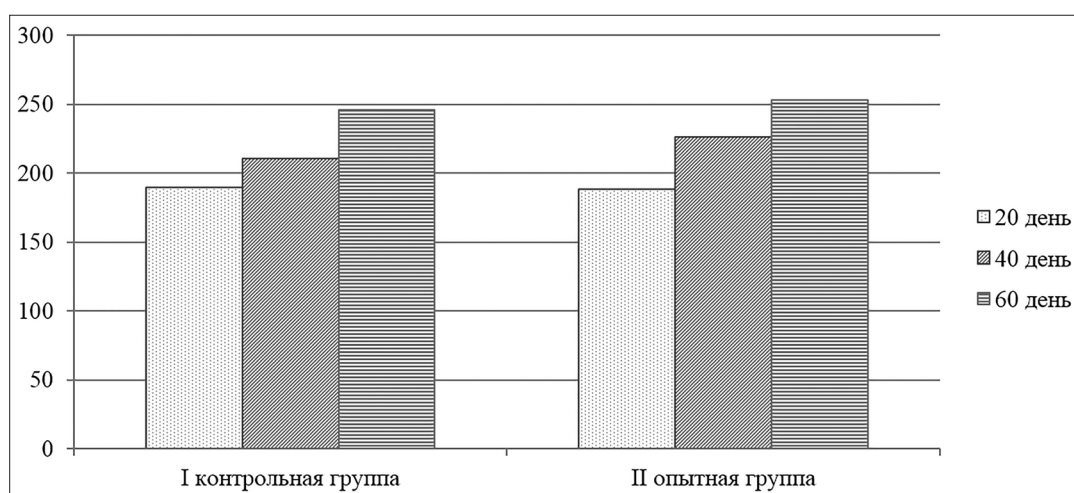


Рис. 1. Средние показатели массы телят, кг

Таблица 3

Результаты взвешиваний телят в опыте

| Показатели | Группы животных | |
|---|-----------------|-------------|
| | I контрольная | II опытная |
| Масса в начале исследования, кг | 189,6±4,32 | 188,5±3,529 |
| Масса в конце исследования, кг | 245,7±2,49 | 252,9±4,25 |
| Среднесуточный прирост, г | 935±2,18 | 1073±1,24 |
| Валовый прирост, кг | 56,1±3,21 | 64,4±4,03 |
| Процент среднесуточного прироста к контролю | - | 14,8 |

В результате исследования установлено, что за период проведения опыта телята обеих групп увеличили свою массу, но животные, которые получали в своем рационе кормовую добавку с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной, получили 14,8% среднесуточного прироста к животным из контрольной группы.

Следовательно, можно полагать, что для улучшения гематологических и биохимических показателей телят и эффективного прироста их массы целесообразно в кормлении животных к основному рациону добавлять 1 кг пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной.

Заключение

Выполненное исследование позволило сделать такие выводы:

1. Включение в рацион телят 2–3-месячного возраста 1 кг пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной повлияло на увеличение количества эритроцитов и лейкоцитов — на 9,4%, 6,9% соответственно. На 40-й день опыта уровень общего белка в крови телят опытной группы превышал показатели телят контрольной группы на 3,8%, а на конец исследования — на 4,8%. Повышение гемоглобина на 8,3% отмечено на 20-й день опыта.

2. Также установлено, что уровень глюкозы в крови телят, рацион которых был обогащен добавкой, характеризовался стабильностью по сравнению с контрольной группой телят, которых кормили стандартным рационом. Кроме того, у телят, которым давали пробиотическую кормовую добавку, уровень холестерина в крови на 18–24% был ниже по сравнению с контрольной группой животных.

3. Применение пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной может стимулировать окислительно-восстановительные и обменные процессы, повышать интенсивность протекания метаболических реакций и ферментативную активность в организме телят, в результате чего возможно увеличение их среднесуточного прироста массы тела на 14,8%.

4. Исследование указанной добавки имеет практическое значение для животноводства и сельского хозяйства в целом. Результаты могут быть использованы для оптимизации кормления телят и повышения продуктивности животноводства.

5. Перспектива дальнейших исследований состоит в изучении использования пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной в комбинации с другими добавками, такими как пребиотики и антиоксиданты, для повышения их эффективности и возможного влияния на качество мяса телят.

Литература

1. Ковалев С.П., Киселенко П.С., Трушкинин В.А. Показатели крови у больных кетозом коров / Актуальные проблемы инновационного развития животноводства: сб. науч. тр. междунар. науч.-практ. конф. Брянск: Изд-во Брянский ГАУ. — 2019. — С. 86–89.
2. Козинец А.И., Надаринская М.А., Голушко О.Г., Козинец Т.Г., Гоначова С.А., Гринь М.С., Голубицкий В. Субстрат твёрдофазной культуры гриба вёшенка обыкновен-

ная «*Pleurotus ostreatus*» в кормлении крупного рогатого скота // Зоотехническая наука Беларуси. — 2015. — Т. 50. — № 1. — С. 309–318.

3. Котарев В.И., Большаков В.Н., Брюхова И.В. Влияние кормовых добавок на микробное сообщество рубцовой жидкости телят // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2021. — Т. 1. — № 14. — С. 65–75.
4. Крупицын В.В., Котарев В.И. Коррекция обменных процессов организма лактирующих коров при учёте биохимических показателей крови путём введения в рацион кормления биологически активных веществ // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2020. — Т. 4. — № 13. — С. 109–122.
5. Науменко П.А., Комкова Е.А., Зайналабдиева Х.М., Арсанукаев Д.Л. Гематологические показатели крови у телят молочного периода выращивания // Вестник Орел ГАУ. — 2013. — Т. 1. — № 13. — С. 122–125.
6. Сабитов М.Т., Мазитов В.А. Комплексная кормовая добавка // Животноводство России. — 2006. — № 11. — С. 49–50.
7. Симонова Л.Н., Симонов Ю.И. Эффективность диагностики и комплексного лечения кетоза коров в условиях промышленного молочного производства // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2020. — Т. 6. — № 86. — С. 209–213.
8. Ческидова Л.В., Брюхова И.В., Григорьева Н.А. Перспективные направления создания лекарственных средств нового поколения для животных с применением биотехнологий (обзор) // Ветеринарный фармакологический вестник. — 2019. — Т. 2. — № 7. — С. 29–38.
9. Ashaolu T.J., Reale A.A. Holistic review on Euro-Asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables // Microorganisms. — 2020. — Vol. 8. — No. 8. — Art. 1176. doi: 10.3390/microorganisms8081176.
10. Cheremushkina I.V., Shakhov A.G., Sashnina L.Y., Chernitsky A.E. Antagonistic activity of a probiotic Prolam in point of bacterial pathogens and its influence on an intestines microbiocenosis, the immune and clinical status of calfs // Journal of Animal and Veterinary Advances. — 2015. — Vol. 14. — No. 6. — P. 182–191.
11. Coura F.M., Freitas M.D., Ribeiro J., de Leme R.A. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, *Rotavirus*, and *Coronavirus* isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd // Tropical Animal Health and Production. — 2015. — Vol. 47. — No. 1. — P. 3–11.
12. Ghane M., Babaeekhou L., Ketabi S.S. Antibiofilm activity of kefir probiotic lactobacilli against uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) // Avicenna Journal of Medical Biotechnology. — 2020. — Vol. 12. — P. 221–229.
13. Hadi J., Brightwell G. Safety of alternative proteins: Technological, environmental and regulatory aspects of cultured meat, plant-based meat, insect protein and single-cell protein

- // Foods. — 2021. — Vol. 10. — No. 6. — Art. 1226. doi: 10.3390/foods10061226
14. Jacobson M.F., DePorter J. Self-reported adverse reactions associated with mycoprotein (Quorn-brand) containing foods // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. — 2018. — Vol. 120. — P. 626–630.
 15. Katona S.J., Kaminski E.R. Sensitivity to Quorn mycoprotein (*Fusarium venenatum*) in a mould allergic patient // *Journal of Clinical Pathology*. — 2002. — Vol. 55. — P. 876–877.
 16. Kumar M.R., Azizi N.F., Yeap S.K., Abdullah J.O., Khalid M., Omar A.R., Osman M.A., Leow A.T.C., Mortadza S.A.S., Alitheen N.B. Clinical and preclinical studies of fermented foods and their effects on Alzheimer's disease // *Antioxidants*. — 2022. — Vol. 11. — No. 5. — Art. 883. doi: 10.3390/antiox11050883.
 17. Menezes A.G.T., Ramos C.L., Cenzi G., Melo D.S., Dias D.R., Schwan R.F. Probiotic potential, antioxidant activity, and phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. — 2020. — Vol. 12. — P. 280–288.
 18. Molitorisová A., Monaco A., Purnhagen K.P. An analysis of the regulatory framework applicable to products obtained from mushroom and mycelium // *SSRN Electronic Journal*. — 2021. — P. 1–84.
 19. Roy D., Fahim A. The effect of different level of mushroom (*Agaricus bisporus*) and probiotics (*Saccharomyces cerevisiae*) on sensory evaluation of broiler meat // *Journal of Entomology and Zoology Studies* — 2019. — Vol. 7. — No. 4. — P. 347–349.
 20. Shankar A., Sharma K.K. Fungal secondary metabolites in food and pharmaceuticals in the era of multi-omics. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. — 2022. — Vol. 106. — P. 3465–3488.
 1. Kovalev SP, Kiselenko PS, Trushkinin VA. Pokazateli krovi u bol'nykh ketozom korov. Aktual'nyye problemy innovatsionnogo razvitiya zhitovnovodstva: sb nauch tr mezhdunar nauch-prakt konf. Bryansk: Izd-vo Bryanskiy GAU 2019: 86–89 (in Russian).
 2. Kozinets AI, Nadarinskaya MA, Golushko OG, Kozinets TG, Gonakova SA, Grin' MS, Golubitskiy V. Substrat tvordofaznoy kul'tury griba veshenka obyknovennaya «*Rleurotus ostreatus*» v kormlenii krupnogo rogatogo skota. *Zootekhnicheskaya nauka Belarusi* 2015; 50(1):309–318 (in Russian).
 3. Kotarev VI, Bol'shakov VN, Bryukhova IV. Vliyaniye kormovykh dobavok na mikrobnoye soobshchestvo rubtsovoy zhidkosti telyat. *Veterinarnyy farmakologicheskyy vestnik* 2021; 1(14):65–75 (in Russian).
 4. Krupitsyn VV, Kotarev VI. Korrektsiya obmennykh protsessov organizma laktiruyushchikh korov pri uchote biokhimicheskikh pokazateley krovi putom vvedeniya v ratsion kormleniya biologicheskii aktivnykh veshchestv. *Veterinarnyy farmakologicheskyy vestnik* 2020; 4(13):109–122 (in Russian).
 5. Naumenko PA, Komkova YeA, Zaynalabdiyeva KhM, Arsanukayev DL. Gematologicheskyye pokazateli krovi u telyat molochnogo perioda vyrashchivaniya. *Vestnik Orel GAU* 2013; 1(13):122–125 (in Russian).
 6. Sabitov MT, Mazitov VA. Kompleksnaya kormovaya dobavka. *Zhivotnovodstvo Rossii* 2006; 11:49–50 (in Russian).
 7. Simonova LN, Simonov YuI. Effektivnost' diagnostiki i kompleksnogo lecheniya ketoza korov v usloviyakh promyshlennogo molochnogo proizvodstva. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 2020; 6(86):209–213 (in Russian).
 8. Cheskidova LV, Bryukhova IV, Grigor'yeva NA. Perspektivnyye napravleniya sozdaniya lekarstvennykh sredstv novogo pokoleniya dlya zhitovnykh s primeneniyem biotekhnologii (obzor). *Veterinarnyy farmakologicheskyy vestnik* 2019; 2(7):29–38 (in Russian).
 9. Ashaolu TJ, Reale AA. Holistic review on Euro-Asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables. *Microorganisms* 2020; 8(8):1176. doi: 10.3390/microorganisms8081176.
 10. Cheremushkina IV, Shakhov AG, Sashnina LY, Chernitskiy AE. Antagonistic activity of a probiotic Prolam in point of bacterial pathogens and its influence on an intestines microbiocenosis, the immune and clinical status of calfs. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2015; 14(6):182–191.
 11. Coura FM, Freitas MD, Ribeiro J, de Leme RA. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, *Rotavirus*, and *Coronavirus* isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Tropical Animal Health and Production* 2015; 47(1):3–11.
 12. Ghane M, Babaekhou L, Ketabi SS. Antibiofilm activity of kefir probiotic lactobacilli against uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 2020; 12:221–229.
 13. Hadi J, Brightwell G. Safety of alternative proteins: Technological, environmental and regulatory aspects of cultured meat, plant-based meat, insect protein and single-cell protein. *Foods* 2021; 10(6):1226. doi: 10.3390/foods10061226
 14. Jacobson MF, DePorter J. Self-reported adverse reactions associated with mycoprotein (Quorn-brand) containing foods. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2018; 120:626–630.
 15. Katona SJ, Kaminski ER. Sensitivity to Quorn mycoprotein (*Fusarium venenatum*) in a mould allergic patient. *Journal of Clinical Pathology* 2002; 55:876–877.
 16. Kumar MR, Azizi NF, Yeap SK, Abdullah JO, Khalid M, Omar AR, Osman MA, Leow ATC, Mortadza SAS, Alitheen NB. Clinical and preclinical studies of fermented foods and their effects on Alzheimer's disease. *Antioxidants* 2022; 11(5):883. doi: 10.3390/antiox11050883.
 17. Menezes AGT, Ramos CL, Cenzi G, Melo DS, Dias DR, Schwan RF. Probiotic potential, antioxidant activity, and

- phytase production of indigenous yeasts isolated from indigenous fermented foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2020; 12:280–288.
18. Molitorisová A, Monaco A, Purnhagen KP. An analysis of the regulatory framework applicable to products obtained from mushroom and mycelium. *SSRN Electronic Journal* 2021;1–84.
19. Roy D, Fahim A. The effect of different level of mushroom (*Agaricus bisporus*) and probiotics (*Saccharomyces cerevisiae*) on sensory evaluation of broiler meat. *Journal of Entomology and Zoology Studie* 2019; 7(4):347–349.
20. Shankar A, Sharma KK. Fungal secondary metabolites in food and pharmaceuticals in the era of multi-omics.. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2022; 106:3465–3488.

INFLUENCE OF PROBIOTIC FEED ADDITIVE WITH OYSTER MUSHROOM MYCELIUM GRAIN ON HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF CATTLE AS STUDIED IN CALVES

S.V. POLSKIKH, V.A. GRYZLOV, A.A. IVANOV

Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh

The aim of the work is to determine the effect of a probiotic feed additive with grain mycelium of Oyster mushroom on the hematological and biochemical parameters of calves. To achieve this goal, a study was conducted on two groups of calves, each of which had 20 heads. Animals from the control group, in addition to their main diet, additionally received 1 kg per day of feed additive with grain mycelium Oyster mushroom. As a result of the study, it was found that the inclusion of 1 kg of a probiotic feed additive with grain mycelium of Oyster mushroom in the diet of 2–3-month-old calves affected the increase in the number of erythrocytes and leukocytes – by 9.4%, 6.9%, respectively. On the 20th day of the experiment, an increase in hemoglobin by 8.3% was noted. It was also found that the level of glucose in the blood of calves whose diet was enriched with the additive was characterized by stability compared to the control group of calves, and the level of cholesterol in the blood was lower by 18–24%. In addition, the average daily weight gain of calves as a result of the experiment was 14.8% in relation to the control. Therefore, it can be noted that the use of a probiotic feed additive with grain mycelium Oyster mushroom can have a stimulating effect on redox and metabolic processes, as well as increase the intensity of metabolic reactions and enzymatic activity in the body of calves. The study is of practical importance for animal husbandry and agriculture in general, as the results obtained can be used to optimize the feeding of calves and increase the productivity of animal husbandry.

Keywords: probiotics, cattle breeding, calves, feed, blood serum, diet, weight gain, total protein, hemoglobin, blood biochemistry, cattle.

Address:

Polskikh S.V., Candidate of biological sciences.
Associated professor of Department of Private zootechnics.
Voronezh State Agrarian University named after Emperor
Peter the Great, Voronezh
E-mail: s-polskikh5958@rambler.ru

Для цитирования:

Польских С.В., Грызлов В.А., Иванов А.А. Влияние пробиотической кормовой добавки с зерновым мицелием Вёшенки обыкновенной на гематологические и биохимические показатели крс, изученное у телят. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2023; 19(3):64–70.

For citation:

Polskikh S.V., Gryzlov V.A., Ivanov A.A. Influence of probiotic feed additive with oyster mushroom mycelium grain on hematological and biochemical parameters of cattle as studied in calves. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(3):64–70 (in Russian).

IN SILICO АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ АМИЛАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

М.Г. ХОЛЯВКА^{1,2*}, Д.Ю. БОГОМОЛОВ¹, В.Г. АРТЮХОВ¹

¹Воронежский государственный университет,

²Севастопольский государственный университет

Изучены состав, структура и локализация внутренних полостей, пор и туннелей в составе молекул α -амилаз, а также локализация скоплений заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхностях глобул ферментов из различных продуцентов: *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Tenebrio molitor*, *Pyrococcus woesei*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Sus scrofa*, *Homo sapiens*. Обнаружено по 7 внутренних полостей в составе пространственных структур амилаз, источником которых являются *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Tenebrio molitor* и *Pyrococcus woesei*. Найдено также по 8 полостей в составе α -амилаз из *Geobacillus stearothermophilus* и *Sus scrofa*. Кроме того, показано 10 внутренних полостей в составе амилазы слюны *Homo sapiens*. Установлено наличие двух туннелей в составе амилаз из *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Pyrococcus woesei*, *Homo sapiens*. Показано, что фермент из *Tenebrio molitor* не имеет туннелей в своем составе. Констатировано наличие 1 и 3 туннелей в составе амилаз из *Geobacillus stearothermophilus* и *Sus scrofa* соответственно. Нашли также отсутствие пор во всех молекулах α -амилаз, изучаемых в данной работе. Акцентируется внимание на то, что α -амилаза из слюны *Homo sapiens* имеет наиболее развитую систему внутренних полостей и туннелей, а молекула амилазы из *Tenebrio molitor* имеет наиболее плотную упаковку и при этом на ее поверхности находится минимальное количество гидрофобных аминокислотных остатков в составе скоплений среди изучаемых нами ферментов.

Ключевые слова: α -амилаза, пространственная структура, внутренние полости, туннели, поры.

Введение

α -Амилаза (1,4- α -D-глюканглюкоаногидролаза) является эндоамилазой, вызывающей гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей внутри полимерного субстрата. Это — водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина. В зависимости от вида микроорганизма свойства α -амилаз могут сильно отличаться не только по механизму воздействия на субстрат и по конечным продуктам, но и по оптимальным условиям для проявления максимальной ферментативной активности.

В настоящее время мировой рынок промышленных ферментов превышает 1,6 миллиарда долларов США. Амилазы являются одними из наиболее важных промышленных ферментов, и их применение расширилось,

охватив многие области, включая клиническую, медицинскую и аналитическую химию, в дополнение к их первоначальному применению при разжижении крахмала в текстильной и пищевой промышленности [10].

Среди амилитических ферментов α -амилаза (КФ 3.2.11) представляет значительный коммерческий интерес, поскольку она широко используется для производства подсластителей из крахмала. Благодаря высокой эффективности и специфичности амилазы находят широкое применение в промышленности и медицине, биотехнологии и научных исследованиях. В связи с этим возникает необходимость совершенствования способов регулирования активности α -амилаз, что стимулирует высокий научный интерес к ним. Подробное изучение пространственной структуры α -амилаз необходимо для понимания особенностей их функционирования, а также является важным этапом разработки технологических процессов для биотехнологического использования.

Молекула α -амилазы содержит три домена. Крупный центральный N-концевой домен состоит из 330 аминокислотных остатков, имеет типичную параллельно-цепочечную структуру α - β -ствола. C-концевой домен образует отдельную глобулярную субъединицу, которая складывается в восьмицепочечный антипараллельный

© 2023 г. Холявка М.Г., Богомолов Д.Ю., Артюхов В.Г.

* Автор для переписки:

Холявка Марина Геннадьевна

д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж; профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет, Севастополь

E-mail: holyavka@rambler.ru

β -ствол. Третий домен находится между β -складкой и α -спиралью центрального домена. Активный центр расположен в щели внутри N-концевого центрального домена [4, 5, 7]. Связывание различных субстратов с α -амилазой позволяет предположить, что аминокислотные остатки, участвующие в каталитической реакции, представляют собой пару аспарагиновых кислот. Рядом с областью активного центра расположен ион кальция. Сайт связывания кальция является общей структурной особенностью всех α -амилаз. Установлено, что атомы кальция не участвуют непосредственно в каталитическом акте амилаз, но участвуют в формировании активной конформации молекулы фермента [9, 15]. Некоторые авторы считают, что кальций и кобальт являются активаторами и стабилизаторами энзима, увеличивая термостабильность α -амилазы [12].

α -Амилаза слюны человека состоит из 496 аминокислотных остатков, имеет несколько форм, которые можно разделить на две группы: гликозилированный фермент с молекулярной массой 62 кДа и α -амилаза, не подвергшаяся гликозилированию, массой 56 кДа [2, 16].

Важной особенностью амилазы психрофильной граммотрицательной бактерии *Pseudoalteromonas haloplanctis* TAB23 является ослабление факторов когезии из-за резкого уменьшения количества солевых мостиков и ароматических взаимодействий, гидрофильной поверхности, рыхлой упаковки гидрофобных остатков ядра, снижения содержания пролина и аргинина и стабилизации диполей спиралей [3].

Известно, что функционирование ферментов во многом определяется их пространственной структурой, которая содержит множество внутренних элементов, таких как туннели, полости и поры, выполняющие различные функции в составе энзимов. В связи с этим возникает необходимость в изучении особенностей их локализации и строения.

Целью настоящей работы был *in silico* анализ особенностей пространственной организации α -амилаз различного происхождения.

Материалы и методы

Объекты исследования. В качестве объектов исследования были выбраны модели пространственной структуры: амилазы слюны человека *Homo sapiens* (PDB ID: 1SMD) [11], α -амилазы кабана *Sus scrofa* (1PIF) [8], α -амилазы из *Pyrococcus woesei* (1MWO) [6], α -амилазы личинки большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (1JAE) [13], α -амилазы из *Pseudoalteromonas*

haloplanktis (1B0I) [1], α -амилазы из *Geobacillus stearothermophilus* (1HVX) [14].

Методы изучения внутренних полостей, туннелей и пор. Исследование туннелей, пор и полостей осуществляли в программном обеспечении MOLE. Полость — закрытое пространство внутри белковой молекулы, которое не имеет точек выхода на её поверхность. Пора — углубление на поверхности или в толще макромолекулы, сообщающееся с её поверхностью через одно отверстие. Туннель — сквозное отверстие в белковой молекуле, которое сообщается с её поверхностью через два или более отверстий.

Определение состава скоплений (кластеров) заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков. Скоплением (кластером) считали группу аминокислотных остатков на поверхности фермента, в которой расстояние между самыми близко расположенными атомами этих аминокислот не превышало значение 10 Å. Это расстояние (r) вычисляли на основе их координат (x , y , z) по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}.$$

Визуализация пространственных структур макромолекул. Визуализация пространственных структур ферментов осуществлялась при помощи программ Maestro и Swiss-PdbViewer.

Результаты и обсуждение

Пространственная структура α -амилаз различного происхождения. В составе α -амилазы из *Pseudoalteromonas haloplanktis* обнаружено 7 внутренних полостей и 2 туннеля. Альфа-амилаза, источником которой является *Geobacillus stearothermophilus*, имеет в своем составе 8 внутренних полостей и один туннель. Анализ структуры α -амилазы личинки большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* показал, что молекула содержит 7 внутренних полостей и не имеет туннелей в своей структуре. В составе α -амилазы из *Pyrococcus woesei* установлено 7 внутренних полостей и 2 туннеля. Альфа-амилаза кабана *Sus scrofa* имеет в своем составе 8 полостей и 3 туннеля. При анализе пространственной организации амилазы слюны человека *Homo sapiens* найдено 10 внутренних полостей и 2 туннеля. Выявлена сходная по локализации и аминокислотному составу пара туннелей в составе амилаз кабана *Sus scrofa* и слюны человека *Homo sapiens*. Локализация внутренних полостей в составе изученных пространственных структур биомолекул представлена на рисунке 1.

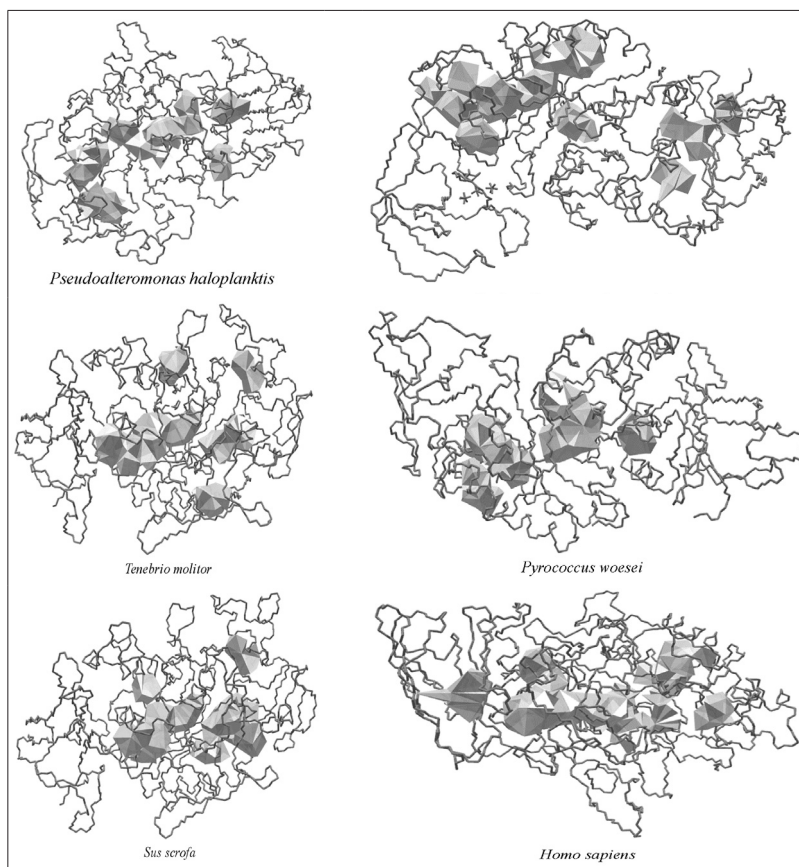


Рис. 1. Локализация внутренних полостей (выделены серым цветом) в составе амилаз различного происхождения

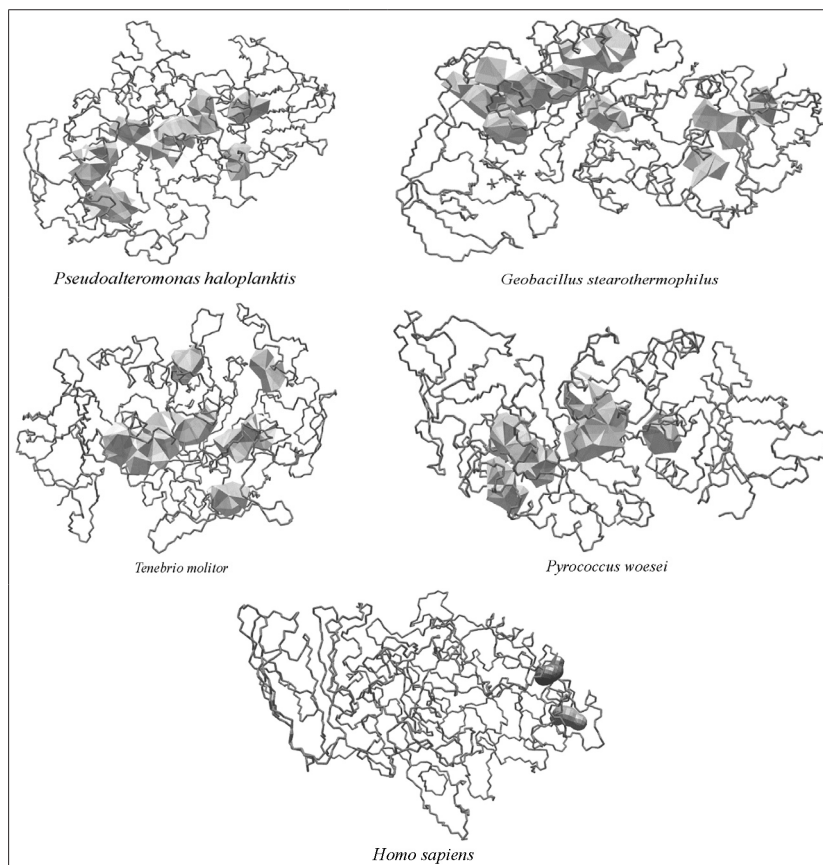


Рис. 2. Локализация туннелей (выделены серым цветом) в составе амилаз различного происхождения

На рисунке 2 отображено местонахождение обнаруженных туннелей молекул проанализированных ферментов. Аминокислотный состав туннелей амилаз

различного происхождения приведен в таблице 1. Поры не обнаружены в составе пространственных структур изучаемых ферментов.

Таблица 1

Аминокислотный состав туннелей в составе молекул альфа-амилаз из различных источников

| Источник фермента | № туннеля | Аминокислоты |
|---------------------------------------|-----------|---|
| <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | 1 | Тyr 23, Lys 27, Tyr 29, Ala 343, Val 346 |
| | 2 | Asp 203, Ala 211, Ser 212, Glu 222, Phe 223, Lys 224, Met 251 |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | 1 | Tyr 63, Leu 65, Glu 67, Lys 81, Tyr 151, Trp 221, Thr 225 |
| <i>Pyrococcus woesei</i> | 1 | Val 264, Leu 267, Gln 268, Tyr 306, Thr 341, Ile 343, Leu 351 |
| | 2 | His 390, Glu 391, Tyr 392, Gly 394, Gly 398, Trp 399 |
| <i>Sus scrofa</i> | 1 | Ser 55, Arg 56, Arg 72, Gly 359, Pro 360, Asn 362, Gly 365 |
| | 2 | Ser 55, Arg 56, Arg 72, Trp 357, Ile 358, Gly 359, Pro 360, Asn 362 |
| | 3 | Phe 136, Asp 138, Gly 146, Gln 161, Leu 166, Asp 167 |
| <i>Homo sapiens</i> | 1 | Phe 136, Asn 137, Asp 138, Cys 141, Gly 146, Asp 159, Arg 161, Leu 166, Asp 167 |
| | 2 | Asn 137, Lys 140, Arg 158, Asp 159, Leu 168, Leu 170, Gly 171, Trp 203, Asp 206 |

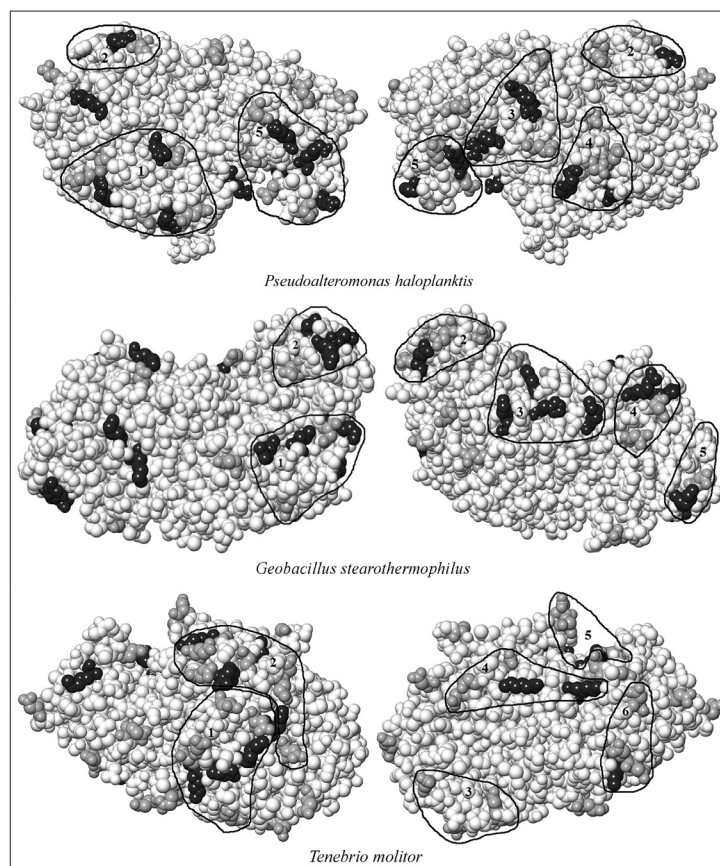


Рис. 3А. Скопления заряженных аминокислотных остатков на поверхности амилаз из *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Geobacillus stearothermophilus* и *Tenebrio molitor*

Распределение аминокислотных остатков на поверхности α -амилаз из различных источников. В составе амилаз из *Pseudoalteromonas haloplanktis* и *Geobacillus stearothermophilus* констатировано по 5 скоплений заряженных аминокислотных остатков.

При анализе пространственной структуры фермента, источником которого является *Pyrococcus woesei*, выявлено 4 скопления заряженных аминокислотных остатков на его поверхности. По 6 таких скоплений обнаружено для амилаз из *Tenebrio molitor*, *Sus scrofa* и *Homo sapiens*.

При этом при сравнении α -амилазы кабана и амилазы слюны человека отмечены сходные по своей локализации и аминокислотному составу скопления заряженных аминокислотных остатков. Локализация скоплений

заряженных аминокислотных остатков в составе амилаз различного происхождения представлена на рисунке 3. Аминокислотный состав обнаруженных скоплений приведен в таблице 2.

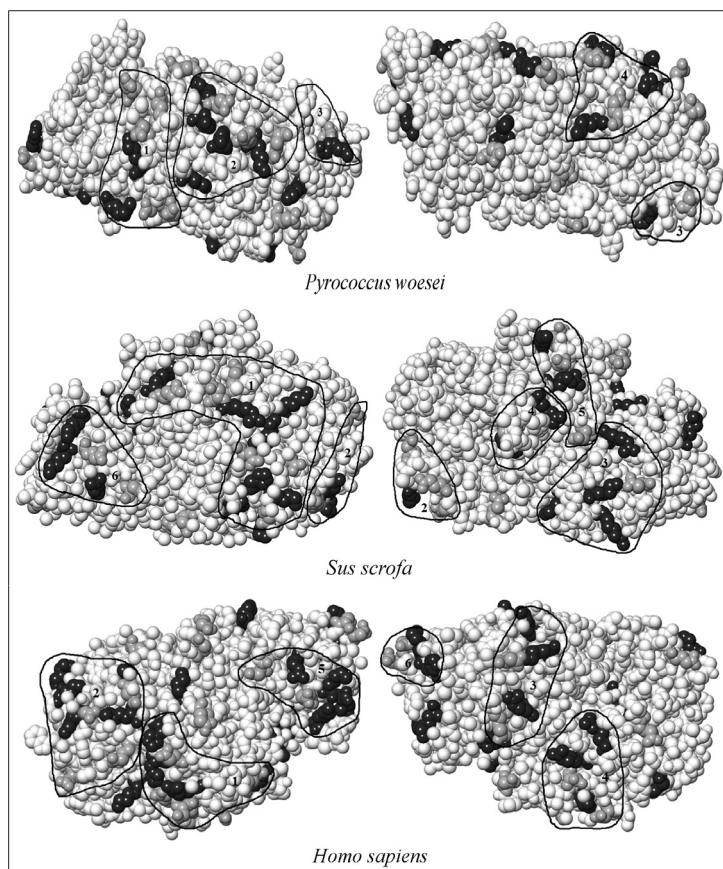


Рис. 3Б. Скопления заряженных аминокислотных остатков на поверхности амилаз из *Pyrococcus woesei*, *Sus scrofa* и *Homo sapiens*. Примечание к рис. 3. Скопления заряженных аминокислотных остатков на поверхности амилаз различного происхождения (справа изображена модель, повернутая на 180° относительно изображения слева; черным выделены отрицательно заряженные аминокислотные остатки, серым — положительно заряженные остатки)

Таблица 2

Состав скоплений заряженных аминокислотных остатков на поверхности альфа-амилаз различного происхождения

| № скопления | Источник фермента | | | | | |
|-------------|---|--|---|--|---|--|
| | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | <i>Tenebrio molitor</i> | <i>Pyrococcus woesei</i> | <i>Sus scrofa</i> | <i>Homo sapiens</i> |
| 1 | Glu21, Arg73, Lys27, Asp69, Arg64, Asp80, Asp162, Lys169, Glu56 | Lys71, Arg52, Asp111, Glu67, Lys141, Lys155 | Lys2, Asp3, Arg216, Glu235, Lys203, Asp213, Asp176, Asp208 | Lys2, Glu39, Glu36, Glu8, Glu7, Asp324, Arg360, Asp358 | Glu29, Arg30, Lys35, Arg80, Glu78, Asp81, Lys185, Asp188, His215, Arg227, Lys68, Asp181, Asp212, Lys213 | Glu29, Arg30, Lys35, Arg80, Glu78, Glu76, Asp77, His185, Asp188, His215, |
| 2 | Asp130, Arg131, Arg133, Glu207, Glu213 | Asp117, Arg179, Arg170, Glu129, Arg174, Asp125, Asp165, Lys171 | Lys20, Asp26, Asp73, Arg30, Glu29, Glu74, Asp79, Arg82, Asp86, His173, Asp169 | Asp28, His29, Arg31, Lys86, Glu87, Arg91, His97, Glu72 | Asp138, Lys140, Lys142, Glu125, Glu149, Asp153, Glu171, Lys172, Asp173 | Asp138, Lys140, Lys142, Asp125, Glu149, Lys172, Asp173, Lys213, Glu181, Lys208, Asp212 |

| | | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|--|
| 3 | Arg234, Glu279, Glu228, Arg282 | Asp269, Lys272, His274, Glu192, Lys279, Lys317 | Asp141, Asp143, Glu229, Glu135 | Asp116, Lys133, Lys76, Asp125 | Lys261, Lys268, Lys273, Glu282, Lys278, Asp411, Asp433, Arg319 | Lys268, Lys273, Lys261, Arg319, Asp433, Glu484 |
| 4 | Asp310, Arg60, His308, Asp264, Asp312 | Arg308, His405, Asp404, Asp401 | Lys300, Asp327, Asp330, Lys303, Asp332 | Glu156, Lys201, His168, Glu237, Arg209 | His305, Glu352, Asp300, Arg346 | Arg343, Asp381, Arg346, Lys368, Asp363, Glu369 |
| 5 | Asp347, Glu408, Lys406, Asp354, Glu419, Lys443, Lys446, Asp395, Asp412, Lys414 | Lys447, Lys442, Glu469, Asp465 | Asp351, Asp350, Arg365, Glu431 | - | Arg343, Asp381, Lys368, Asp317, Glu369 | Arg424, Glu493, Asp402, Lys495, Lys457, Lys466 |
| 6 | Asp390, Asp389, Lys262, Asp410 | - | - | - | Arg424, Glu493, Asp402, Lys495, Lys457, Lys496, Lys466 | Asp472, Asp471, Lys474, His476 |

При анализе поверхностей амилаз из *Pseudoalteromonas haloplanktis* и *Sus scrofa* показано наличие по 7 скоплений гидрофобных аминокислотных остатков. Альфа-амилаза, источником которой является *Geobacillus stearothermophilus*, имеет на своей поверхности 6 таких скоплений. Остальные ферменты, изученные в настоящей работе, содержат по 5 скоплений гидрофобных аминокислотных остатков на своей поверхности, причем на поверхности молекулы амилазы из *Tenebrio*

molitor находится минимальное количество (33 остатка) гидрофобных аминокислот в составе скоплений. Молекулы амилаз из *Sus scrofa* и *Homo sapiens* имеют на своих поверхностях сходные по локализации и составу скопления гидрофобных аминокислотных остатков. Локализация гидрофобных аминокислотных остатков на поверхностях амилаз из различных источников представлена на рисунке 4. Таблица 3 содержит сведения об аминокислотном составе данных скоплений.

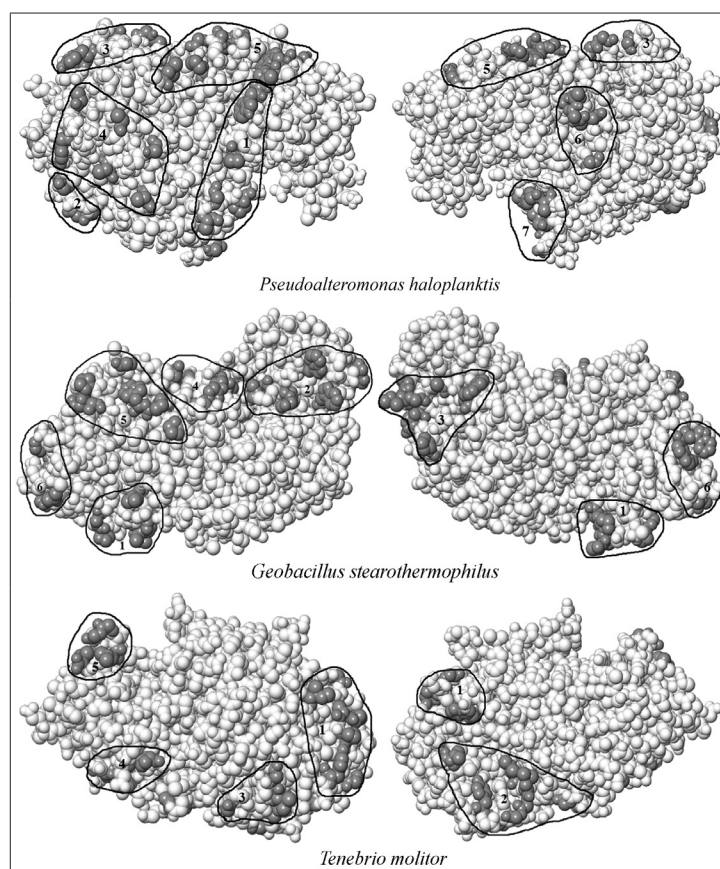


Рис. 4А. Скопления гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности амилаз из *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Geobacillus stearothermophilus* и *Tenebrio molitor*

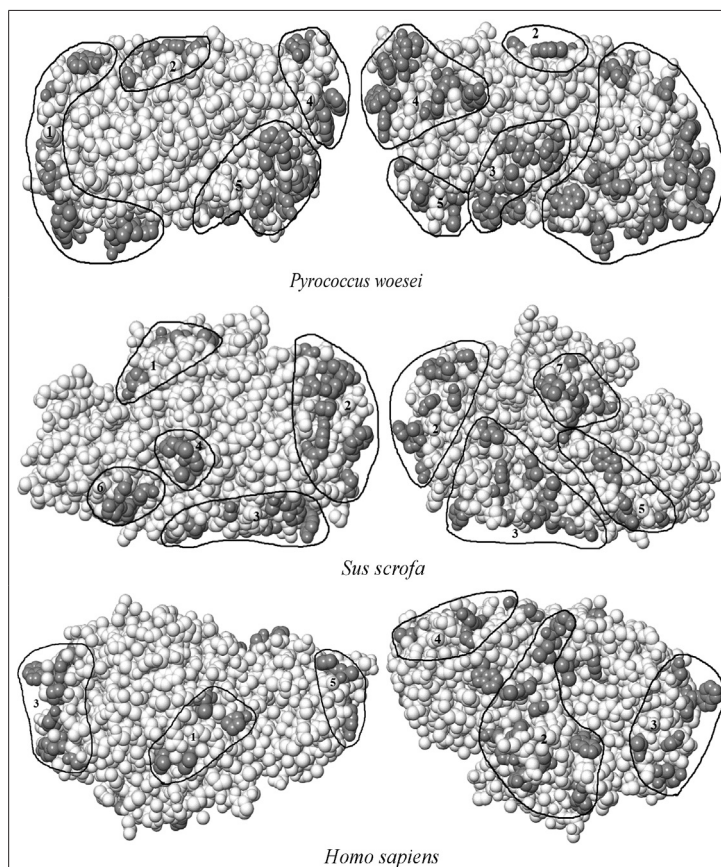


Рис. 4Б. Скопления гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности амилаз из *Pyrococcus woesei*, *Sus scrofa* и *Homo sapien*. Примечание к рис. 4. Скопления гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности амилаз различного происхождения (справа изображена модель, повернутая на 180° относительно изображения слева; серым выделены гидрофобные аминокислотные остатки)

Таблица 3

Состав скоплений гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности альфа-амилаз различного происхождения

| № скопления | Источник фермента | | | | | |
|-------------|---------------------------------------|--|--|---|--|--|
| | <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | <i>Tenebrio molitor</i> | <i>Pyrococcus woesei</i> | <i>Sus scrofa</i> | <i>Homo sapiens</i> |
| 1 | Pro2, Gly78, Trp356, Pro26, Ala76 | Ala1, Ala2, Pro3, Phe4, Pro420, Gly421, Ile389 | Val50, Val106, Gly53, Trp57, Gly110, Ala122, Ile66, Pro121, Pro124, Tyr162, Gly128, Gly159 | Trp18, Pro21, Tyr58, Phe159, Gly23, Ile25, Val79, Gly160, Gly161, Tyr73, Tyr74, Gly77, Trp128, Ala135, Gly137, Leu117, Trp119, Pro121, Phe122, Val123, Gly124, Tyr126, Leu144, Leu151, Trp171, Tyr174, Trp206, Trp214 | Leu26, Val22, Pro34, Ile372 | Leu26, Val22, Pro34, Val89 |
| 2 | Pro109, Gly100, Ala99, Pro113 | Trp115, Trp139, Tyr159, Trp166, Tyr201, Leu199 | Tyr139, Ile224, Val151, Leu226, Gly227, Gly228, Ala230, Gly272, Pro269 | Gly239, Tyr236, Gly217, Phe279 | Gly106, Ala108, Gly122, Ala109, Gly112, Gly116, Tyr118, Pro127, Ala128, Pro130, Ala133, Trp134, Gly139, Tyr174 | Phe55, Trp59, Val354, Pro345, Tyr347, Phe348, Gly351, Gly304, Gly309, Ala310, Trp316, Leu237, Gly238, Gly239, Pro241, Trp269, Gly285, Tyr151, Ile235 |

| | | | | | | |
|---|--|--|--------------------------------|--|--|--|
| 3 | Gly128, Gly206, Gly205, Tyr132 | Gly180, Ile181, Gly182, Ala184, Trp187, Pro209 | Gly193, Val197, Gly201, Gly238 | Ile292, Trp294, Tyr249, Trp224 | Tyr151, Val163, Ile235, Tyr155, Trp203, Gly205, Ala241, Leu237, Gly238, Gly239, Gly285, Gly283, Pro288, Gly249 | Ala109, Tyr118, Ala106, Gly116, Gly122, Pro127, Pro130, Gly133, Trp134, Gly139, Tyr174, Gly171 |
| 4 | Ala158, Tyr151, Ala165, Ala189, Ala148, Gly193 | Tyr268, Leu338, Tyr296, Ala337, Gly335, Tyr375 | Ala265, Trp385, Val382, Pro316 | Ile343, Tyr346, Tyr380, Tyr265, Trp378, Pro382, Ala385, Gly386, Trp409, Tyr411 | Pro223, Ala224, Gly225, Ala3 | Tyr276, Gly271, Gly283, Phe406, Pro332, Pro405, Trp409, Tyr410, Leu438, Gly403 |
| 5 | Trp240, Trp248, Trp361, Gly247, Gly249, Pro252, Val358, Trp362, Leu215, Ala357 | Trp345, Pro344, Gly302, Pro378, Gly474, Pro432, Gly433 | Leu432, Leu471, Gly435, Gly434 | Pro372, Trp374, Tyr423, Pro419, Gly394, Gly397, Trp399, Ala420, Gly422, Trp320 | Trp269, Gly271, Tyr276, Gly304, Gly413 | Tyr468, Ala446, Ile465, Pro445 |
| 6 | Gly268, Gly270, Ala272, Gly271, Gly273, Gly309 | Ala445, Gly446, Trp467, Val448, Trp437 | - | - | Pro332, Phe406, Pro405, Gly403 | - |
| 7 | Leu326, Gly324, Phe329, Ala330 | - | - | - | Ala345, Trp316, Phe348, Val349, Gly351, Val354 | - |

Заключение

Показано, что α -амилаза из слюны *Homo sapiens* и α -амилаза кабана имеют наиболее развитую систему внутренних полостей и туннелей, а молекула амилазы из *Tenebrio molitor* характеризуется наиболее плотной упаковкой и при этом на ее поверхности находится минимальное количество гидрофобных аминокислотных остатков в составе скоплений среди изучаемых нами ферментов.

Представленные в статье результаты имеют значительную ценность при выборе источника α -амилазы, которую планируется использовать в качестве промышленного катализатора, и при проектировании условий для его оптимальной работы.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

Литература

1. Aghajari N., Feller G., Gerday C., Haser R. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase give insights into cold adaptation at a molecular level // *Structure*. – 1998. – Vol. 6. – P. 1503–1506.
2. Bank R.A., Hettema E.H., Arwert F., Amerongen A.V., Pronk J.C. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase // *Electrophoresis*. – 1991. – Vol. 12. – No. 1. – P. 74–79.
3. Feller G. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2003. – Vol. 60. – P. 648–662.
4. Fisher S.Z., Govindasamy L., Tu C., Agbandje-McKenna M., Silverman D.N., Rajaniemi H.J., McKenna R. Structure of human salivary α -amylase crystallized in a C-centered monoclinic space group // *Acta Crystallogr. Sect. Biol. Cryst. Commun.* – 2006. – Vol. 62. – Pt. 2. – P. 88–93.
5. Kandra L., Gyémánt G., Remenyik J., Ragunath C., Ramasubbu N. Subsite mapping of human salivary alpha-amylase and the mutant Y151M // *FEBS Lett.* – 2003. – Vol. 544. – No. 1–3. – P. 194–198.
6. Linden A., Mayans O., Meyer-Klaucke W., Antranikian G., Wilmanns M. Differential regulation of a hyperthermophilic alpha-amylase with a novel (Ca, Zn) two-metal center by zinc // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 9875–9884.
7. Mac Gregor E.A., Janecek S., Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2001. – Vol. 1546. – No. 1. – P. 1–20.
8. Machius M., Vertesy L., Huber R., Wiegand G. Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic alpha-amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol. 260. – P. 409–421.
9. Morris C. Impact of calcium on salivary α -amylase activity, starch paste apparent viscosity and thickness perception // *Chemosensory Perception*. – 2011. – Vol. 4. – No. 3. – P. 112–116.
10. Pandley A., Nigam P., Soccol C.R. Advances in microbial amylases // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2000. – Vol. 31. – P. 135–152.
11. Ramasubbu N., Paloth V., Luo Y., Brayer G.D., Levine M.J. Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 1996. – Vol. 52. – No. 3. – P. 435–446.

12. Saboury A.A. Stability, activity and binding properties study of α -amylase upon interaction with Ca^{2+} and Co^{2+} // *Biologia*. – Bratislava. – 2002. – Vol. 57. – No. 11. – P. 221–228.
13. Strobl S., Maskos K., Betz M., Wiegand G., Huber R., Gomis-Ruth F.X., Glockshuber R. Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 278. – P. 617–628.
14. Suvd D., Fujimoto Z., Takase K., Matsumura M., Mizuno H. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability // *J. Biochem.* – 2001. – Vol. 129. – P. 461–468.
15. Takagi T., Toda H., Isemura T. Bacterial and mold amylases // *Enzymes*. – 1971. – Vol. 5. – P. 235–271.
16. Yamamoto T. Enzyme chemistry and molecular biology of amylase and related enzymes. – USA: CRC Press, 1995.

References

1. Aghajari N, Feller G, Gerday C, Haser R. Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase give insights into cold adaptation at a molecular level. *Structure* 1998; 6:1503–1506.
2. Bank RA, Hettema EH, Arwert F, Amerongen AV, Pronk JC. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase. *Electrophoresis* 1991; 12(1):74–79.
3. Feller G. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:648–662.
4. Fisher SZ, Govindasamy L, Tu C, Agbandje-McKenna M, Silverman DN, Rajaniemi HJ, McKenna R. Structure of human salivary α -amylase crystallized in a C-centered monoclinic space group. *Acta Crystallogr Sect Biol Cryst Commun* 2006; 62(Pt. 2):88–93.
5. Kandra L, Gyémánt G, Remenyik J, Rangunath C, Ramasubbu N. Subsite mapping of human salivary alpha-amylase and the mutant Y151M. *FEBS Lett* 2003; 544(1–3):194–198.
6. Linden A, Mayans O, Meyer-Klaucke W, Antranikian G, Wilmanns M. Differential regulation of a hyperthermophilic alpha-amylase with a novel (Ca, Zn) two-metal center by zinc. *J Biol Chem* 2003; 278:9875–9884.
7. Mac Gregor EA, Janecek S, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546(1):1–20.
8. Machius M, Vertesy L, Huber R, Wiegand G. Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic alpha-amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. *J Mol Biol* 1996; 260:409–421.
9. Morris C. Impact of calcium on salivary α -amylase activity, starch paste apparent viscosity and thickness perception. *Chemosensory Perception* 2011; 4(3):112–116.
10. Pandley A, Nigam P, Soccol CR. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* 2000; 31:135–152.
11. Ramasubbu N, Paloth V, Luo Y, Brayer GD, Levine MJ. Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1996; 52(3):435–446.
12. Saboury AA. Stability, activity and binding properties study of α -amylase upon interaction with Ca^{2+} and Co^{2+} . *Biologia, Bratislava* 2002; 57(11):221–228.
13. Strobl S, Maskos K, Betz M, Wiegand G, Huber R, Gomis-Ruth FX, Glockshuber R. Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution. *J Mol Biol* 1998; 278:617–628.
14. Suvd D, Fujimoto Z, Takase K, Matsumura M, Mizuno H. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability. *J Biochem* 2001; 129:461–468.
15. Takagi T, Toda H, Isemura T. Bacterial and mold amylases. *Enzymes* 1971; 5:235–271.
16. Yamamoto T. Enzyme chemistry and molecular biology of amylase and related enzymes. USA: CRC Press, 1995.

IN SILICO ANALYSIS OF THE SPATIAL ORGANIZATION FEATURES FOR AMYLASE MOLECULES OF DIFFERENT ORIGINS

M.G. HOLYAVKA^{1,2}, D.Yu. BOGOMOLOV¹, V.G. ARTYUKHOV¹

¹Voronezh State University,

²Sevastopol State University

The composition, structure and localization of internal cavities, pores and tunnels in α -amylase molecules, as well as the localization of accumulations of charged and hydrophobic amino acid residues on the surfaces of enzyme globules from various producers: *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Tenebrio molitor*, *Pyrococcus woesei*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Sus scrofa*, *Homo sapiens* – were studied. Seven internal cavities were found in the spatial structures of amylases, the source of which are *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Tenebrio molitor*, and *Pyrococcus woesei*; 8 cavities were also found in the α -amylases from *Geobacillus stearothermophilus* and *Sus scrofa*. In addition, 10 internal cavities were found in the saliva amylase of *Homo sapiens*. The presence of two tunnels in

the amylases from *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Pyrococcus woesei*, *Homo sapiens* was established. It has been shown that the enzyme from *Tenebrio molitor* does not have tunnels. The presence of tunnels 1 and 3 was found in the amylases from *Geobacillus stearothermophilus* and *Sus scrofa*, respectively. The absence of pores in all molecules of α -amylases studied in this work was also adopted. It was shown that α -amylase from the saliva of *Homo sapiens* has the most developed system of internal cavities and tunnels, while the amylase molecule from *Tenebrio molitor* has the most dense packing and, at the same time, on its surface there is a minimum amount of hydrophobic amino acid residues in the composition of clusters among the enzymes studied by us.

Keywords: α -amylase, spatial structure, internal cavities, tunnels, pores.

Address:

Kholyavka M.G.,
Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department
of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University,
Voronezh; Professor of the Department of Physics, Sevastopol
State University, Sevastopol
E-mail: holyavka@rambler.ru

Для цитирования:

Холявка М.Г., Богомолов Д.Ю., Артюхов В.Г. *In silico* анализ особенностей пространственной организации молекул амилаз различного происхождения. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3):71–80.

For citation:

Holyavka M.G., Bogomolov D.Yu., Artyukhov V.G. *In silico* analysis of the spatial organization features for amylase molecules of different origins. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3):71–80 (in Russian).

ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕКТИНОВО-ЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ ПЛЕНКИ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ СВОЙСТВ

Т.В. ШАРОВА, Т.И. ВАСИЛЬЕВА*, Н.А. КЛЕНОВА, П.А. ПАНОВ

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева, Самара

Разработан метод, с помощью которого была получена пектиново-целлюлозная пленка на основе известного метода получения пленок бактериальной целлюлозы симбиотическими микроорганизмами *Medusomyces gisevii* при добавлении в среду культивирования яблочного пектина в концентрации 10 г/л. Были отмечены антибактериальные свойства пектиново-целлюлозной пленки в отношении культур *E. coli* и *Staph. epidermidis* по сравнению с пленками без пектина. Антибактериальный эффект сухой пектиново-целлюлозной пленки, заранее вымоченной в мирамистине, выше на 30%, чем сухой целлюлозной пленки, также заранее вымоченной в мирамистине. Изучены также другие эффекты на основе указанной пленки. Считают, что пектиново-целлюлозная пленка является перспективным материалом для использования в качестве основы формирования раневых покрытий, косметических масок.

Ключевые слова: культура *Medusomyces gisevii*, целлюлозно-пектиновая пленка, ИК спектры, антибактериальная активность.

Введение

Бактериальная целлюлоза (БЦ) идентична целлюлозе растительного происхождения, имеет сходную молекулярную формулу, но по сравнению с ней обладает уникальными свойствами. Она нетоксична, не содержит других химических соединений (лигнина, гемицеллюлоз и т.д.), поэтому является биосовместимой, что дает возможность использовать бактериальную целлюлозу в биотехнологии, медицине и при создании композитных материалов в качестве армирующего компонента [11]. Бактерии синтезируют целлюлозу из низкомолекулярных соединений (моно-, ди- или олигосахаридов) и выделяют ее в водную среду в виде наноприбрилл [10]. Бактериальная целлюлоза может вмещать достаточно большое количество водных растворов в отличие от целлюлозы растительного происхождения [18]. Кроме того, преимуществами ее использования являются ее газопроницаемость, механическая прочность и биодegradуемость.

Одним из перспективных компонентов для формирования композитов являются пектины [18]. Это — высокомолекулярные полисахариды, входящие в состав

клеточной стенки растений, в основе которых лежит частично метоксилированная галактоуроносовая кислота. Свойства пектинов уникальны и интересны, они имеют высокую влагоудерживающую способность, применяются в лечебном питании как адсорбенты, связывающие соли тяжелых металлов, токсины и ядовитые вещества [1]. Кроме того, пектины обладают антибактериальными свойствами, могут использоваться как кровоостанавливающие и противоожоговые средства [6].

Мы предположили, что бактериальная целлюлоза со встроенным в её структуру пектином приобретет новые интересные свойства по сравнению с обычной бактериальной целлюлозой.

Одним из перспективных продуцентов бактериальной целлюлозы является культура *Medusomyces gisevii*. Для нее характерен уникальный симбиоз разных видов дрожжей и уксуснокислых бактерий. Дрожжи за счет выделения своих метаболитов стимулируют бактерии к синтезу пленки, которые становятся сравнительно толще. Благодаря такому симбиозу эта культура легко адаптируется к изменениям условий окружающей среды [3].

Ранее нам был выдан патент на получение бактериальной целлюлозно-пектиновой пленки с использованием культуры *Glucanacetobacter sucrofermentans*, выделенной на кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского национального исследовательского университета им. Н.П. Огарева [15]. Однако данная культура неустойчива, подвержена быстрой мутационной изменчивости, что приводит к ухудшению свойств пленок бактериальной целлюлозы.

© 2023 г. Шарова Т.В., Васильева Т.И., Кленова Н.А., Панов П.А.

* **Автор для переписки:**

Васильева Татьяна Ивановна

кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и биоинженерии, ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»

E-mail: vastaty@rambler.ru

Поэтому целью нашей работы стали получение бактериальной пектиново-целлюлозной пленки с помощью культуры микроорганизмов *Medusomyces gisevii* и изучение её антибактериальных свойств.

Материалы и методы

Реагенты. В работе использовали натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрия гидроксид, натрия тетраборат 10-водный, соляную кислоту, серную кислоту, карбазол, этиловый спирт, сульфаминовую кислоту, лимонную кислоту («Мосреактив», Россия), глюкозу, дрожжевой экстракт, агар-агар бактериологический, пептон («Диа-М», Россия). В качестве нового композиционного материала использовали яблочный пектин. Внедряли в состав пленок следующие антибактериальные соединения — мирамистин (ООО «Инфамед К», Россия), хлоргексидина биглюконат (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», Россия).

Культивирование микроорганизмов и получение бактериальной целлюлозы. В работе использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii*. Культуру чайного гриба подвергали серии разведений в стерильной дистиллированной воде и высевали из разведения 1:100000 на агаризованную (1,5%) среду Хестрина — Шрамма. Выросшие клоны подвергали нескольким последовательным клонированиям. Колонии имели округлую форму, грязно-розоватую пигментацию, были гладкими и блестящими. Микроскопирование с увеличением 2000 раз и окраской по Граму обнаруживало палочковидные бактерии, предположительно р. *Glucanacetobacter*. Подобная культура была получена Фан Ми Ханем, в работе которого принадлежность к данному роду доказана с помощью ПЦР-анализа по 16SРНК [12]. Дрожжевых клеток в культуре не было найдено.

Для изготовления пленок использовали инокулят полученной культуры в питательной среде следующего состава: D-глюкоза — 20 г/л; дрожжевой экстракт — 5,0 г/л; пептон — 5,0 г/л; Na_2HPO_4 — 2,7 г/л; лимонная кислота — 1,15 г/л; рН 6,0 [17]. Инокулят культивировали в шейкере-инкубаторе в течение трех суток со скоростью перемешивания 150 об/мин при комнатной температуре. Затем добавляли свежую среду в соотношении 2:1 и культивировали стационарно в течение семи суток при той же температуре, до появления поверхностной пленки бактериальной целлюлозы. Пектиново-целлюлозные пленки получали при культивировании бактерий на среде того же состава и в тех же условиях, но с добавлением яблочного пектина в количестве 10 г/л. Для очистки пленку БЦ промывали

сначала в дистиллированной воде, затем помещали в 0,5%-ный раствор NaOH на 24 часа при температуре 25–27 °С. После промывки в дистиллированной воде пленку помещали в 0,5%-ный раствор соляной кислоты на 24 ч, после чего промывали дистиллированной водой до получения реакции промывочных вод рН 6–7 и высушивали на воздухе при комнатной температуре до постоянной массы.

Определение концентрации пектина в культуральной жидкости. Количественное определение пектина осуществляли карбазол-серным методом [2, 16, 19]. В пробирки с растворами (0,5 мл) добавляли 0,002 мл 1% раствора сульфаминовой кислоты и тщательно перемешивали. Затем пробирки помещали в емкость со льдом и осторожно, по каплям, по стенкам пробирки приливали 3 мл раствора тетрабората натрия в серной кислоте (9,5 г тетрабората натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) на 1 л концентрированной серной кислоты), охлажденного до комнатной температуры, не допуская нагревания смеси. Далее пробирки нагревали на кипящей водяной бане в течение 6 минут и вновь охлаждали в емкости со льдом. В пробирку добавляли 0,1 мл 0,125% раствора карбазола и помещали в кипящую водяную баню уже на 10 минут, а затем вновь охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность растворов на 525 нм. Были построены калибровочные графики для определения пектина в растворе. Концентрации для калибровки: 0,01 г/л, 0,05 г/л, 1 г/л и 2 г/л пектина.

ИК-спектроскопия бактериальных пленок. При изучении состава пектиново-целлюлозных пленок методом ИК-спектроскопии спектры регистрировались с помощью Фурье-спектрофотометра ФСМ-2201 (ООО «Инфаспек», Россия) на кафедре неорганической химии Самарского университета в интервале волновых чисел от 500 см^{-1} до 4000 см^{-1} .

Изучение антибактериального влияния пектиново-целлюлозных пленок, вымоченных в мирамистине относительно бактериальных культур *E. coli* и *Staph. epidermidis*. В связи с наличием в молекуле пектина свободных карбоксильных группировок в составе бактериальной целлюлозной пленки, мы предположили, что он может взаимодействовать с катионообразующими биологически активными веществами с приобретением новых свойств пленок. Таким веществом может быть мирамистин, который обладает бактерицидными свойствами и фагоцитарной активностью.

Схема эксперимента по антибактериальному влиянию пектиново-целлюлозной пленки; целлюлозной пленки; фильтровальной бумаги, вымоченных в мирамистине во влажном состоянии, а также в высушенном, представлена на рисунке 1.

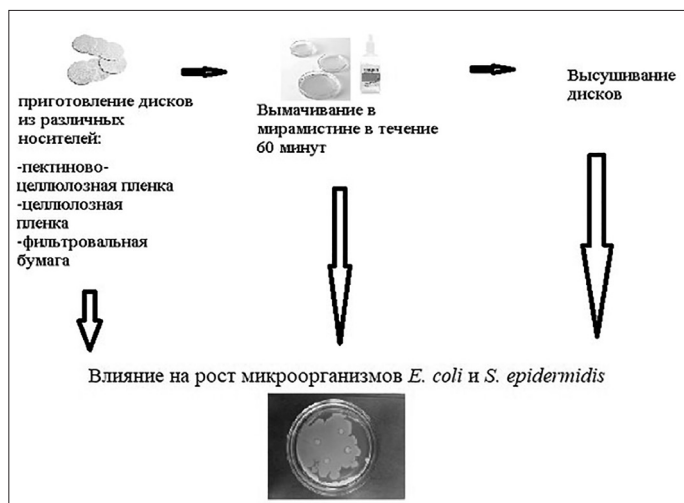


Рис. 1. Схема постановки эксперимента

Диски из готовых пленок и фильтровальной бумаги стерилизовали, выдерживали в мирамистине 60 мин. и высушивали в течение суток в стерильных условиях. Исследование проводили диско-диффузным методом [7], помещая диски из различных носителей в чашки Петри с культурой *E. coli* или *Staph. epidermidis*, и культивировали в термостате при 30 °С. Об антибактериальном эффекте судили по диаметру зон лизиса.

Инокулят *E. coli* готовили из препарата «Коллибактерин» на питательной среде, включающей в себя компоненты в следующих количествах на 250 мл дистиллированной воды: пептон — 1,25 г; глицин — 2,5 г; хлорид натрия — 1,17 г; хлорид калия — 0,3 г; хлорид аммония — 0,27 г; хлорид кальция — 0,11 г; трис(гидроксиметил)аминометан — 1,5 г; гидроортофосфат калия — 0,5 г; сульфат магния — 1,25 г.

Культура *Staph. epidermidis* была получена методом отпечатка с кожи человека на МПА и выделения в чистую культуру методом предельных разведений Коха. Инокулят *Staph. epidermidis* готовили внесением бактериальной петлей части колонии со скошенного агара в 5 мл среды следующего состава: панкреатический гидролизат рыбной муки — 8 г/л, пептон ферментативный — 8 г/л, натрия хлорид — 4 г/л.

Исследование антибактериального влияния пектиново-целлюлозных пленок, вымоченных в хлоргексидине, относительно бактериальных культур *E. coli*. Диски из готовых пленок стерилизовали и выдерживали в 0,05% хлоргексидине 10 мин, затем выкладывали на фильтровальную бумагу в стерильных условиях. Исследование проводили диско-диффузным методом аналогично предыдущему эксперименту.

Статистическую обработку полученных данных проводили стандартным способом с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия с уровнем $p < 0,05$ [13].

Результаты и обсуждение

Для изучения встраивания пектина в структуру бактериальной целлюлозы определяли остаточную концентрацию пектина в культуральной жидкости после создания пленок культурой *Medusomyces gisevii* и изучали спектры полученных целлюлозных пленок с пектином и без него.

С помощью карбазольно-серного метода по калибровочной кривой (рис. 2) была определена концентрация пектина в оставшейся культуральной жидкости после получения готовой пектиново-целлюлозной пленки, которая составила $0,50 \pm 0,02$ г/л. Это в 20 раз меньше концентрации пектина в исходном растворе, что свидетельствует о встраивании пектина в состав пленки.

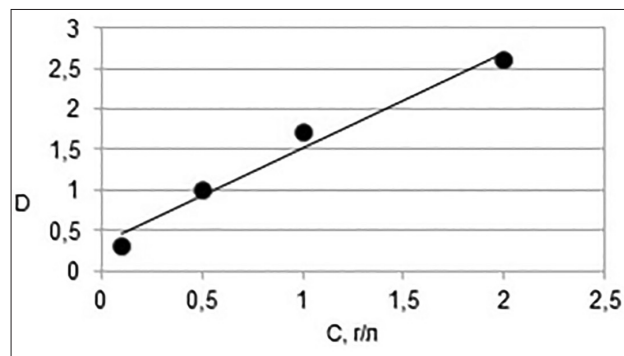


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения концентрации пектина в культуральной жидкости после получения бактериальной пектиново-целлюлозной пленки

Для выявления новой структуры, отличной от обычной бактериальной целлюлозы, проводили ИК-спектроскопию бактериальных целлюлозных пленок, результаты которой представлены на рисунке 3.

В спектре БЦ полосы в диапазоне $2000-1500$ $\text{см}^{-1}\text{см}^{-1}$ принадлежат деформационным колебаниям ОН-групп прочно связанной воды [4]. Слабые полосы поглощения в диапазоне: $1430-1370$ $\text{см}^{-1}\text{см}^{-1}$ обусловлены деформационными колебаниями групп CH_2 ; $1360-132$ $\text{см}^{-1}\text{см}^{-1}$ — деформационные колебания групп ОН в CH_2OH . Полосы при 1281 и 1235 $\text{см}^{-1}\text{см}^{-1}$ указывают на деформационные колебания ОН-групп в спиртах. Полоса при 1204 $\text{см}^{-1}\text{см}^{-1}$ указывает на деформационные колебания ОН-групп. Полосы поглощения в области

1000–1200 см⁻¹ обусловлены в основном валентными колебаниями С-О-С и С-О в спиртах. Таким образом, методом ИК подтверждено, что структура целлюлозы в обычной бактериальной пленке и пектиново-целлюлозной пленке практически не отличается друг от друга.

Отличия были выявлены только в области волновых чисел 810–950 см⁻¹. Это свидетельствует о том, что в структуре целлюлозной пленки с пектином появляются транс-плоскостные двойные связи [5], что говорит о его встраивании в структуру БЦ.

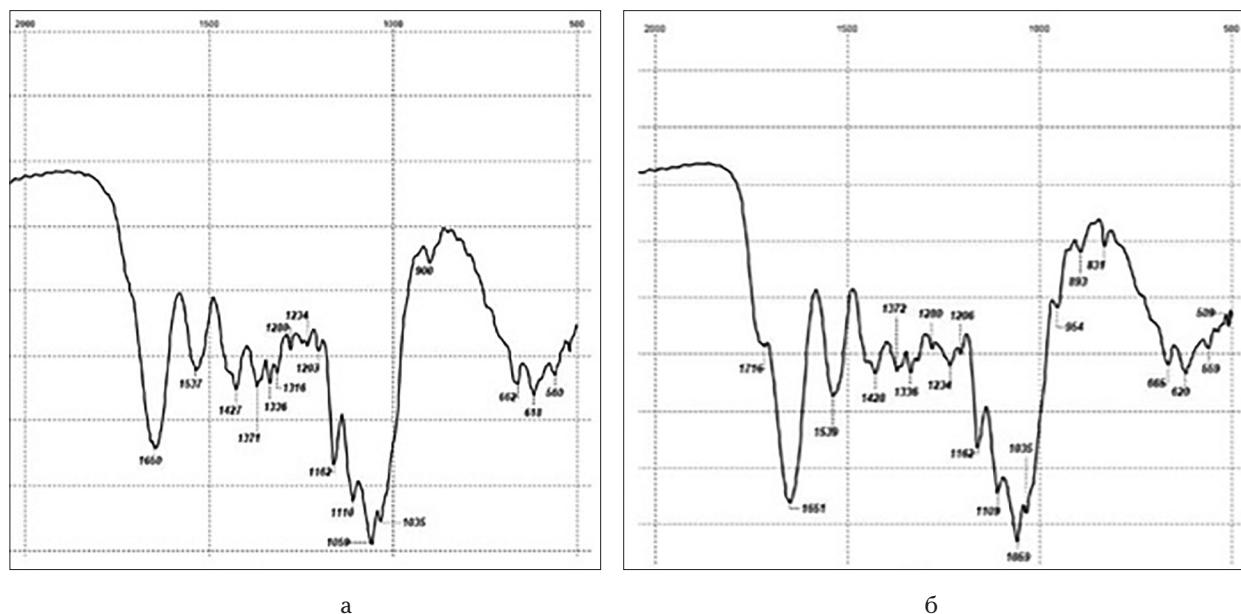


Рис. 3. Спектры бактериальной целлюлозной (а) и пектиново-целлюлозной (б) пленок

Исследование антибактериального влияния пектиново-целлюлозных пленок, вымоченных в мирамистине, относительно бактериальных культур *E. coli* и *Staph. epidermidis* показало, что пектиново-целлюлозная пленка проявляет небольшое антибактериальное действие на бактерии вида *E. coli* и *Staph. epidermidis*, в отличие от бактериальной целлюлозной пленки без пектина и фильтровальной бумаги, где на их поверхности наблюдали сплошной рост бактери-

альных культур (табл.1). Однако такая же пленка и фильтровальная бумага, вымоченные в мирамистине, вызывают значительный антибактериальный эффект, что свидетельствует о дополнительном воздействии мирамистина. Антибактериальный эффект влажной пектиново-целлюлозной пленки, вымоченной в мирамистине, относительно *Staph. epidermidis* достоверно выше на 20%, чем влажной целлюлозной пленки, вымоченной в мирамистине.

Таблица 1

Диаметр зоны подавления роста *E. coli* и *Staph. epidermidis* вокруг дисков из различных носителей

| | Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов, мм | |
|--|---|---------------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>Staph. epidermidis</i> |
| Влажная пектиново-целлюлозная пленка, вымоченная в мирамистине | 8,5±0,3 | 14,8±0,3 |
| Сухая пектиново-целлюлозная пленка, заранее вымоченная в мирамистине | 7,6±0,8 | 16,3±0,3 |
| Сухая пектиново-целлюлозная пленка | 6,3±0,7 | 12,0±0,0 |
| Влажная целлюлозная пленка, вымоченная в мирамистине | - | 12,0±0,00 |
| Сухая целлюлозная пленка, заранее вымоченная в мирамистине | 5,4±0,3 | - |
| Сухая пектиново-целлюлозная пленка | 0, сплошной рост | 0, сплошной рост |
| Влажная фильтровальная бумага, вымоченная в мирамистине | 8,3±1,0 | 14,3±0,7 |
| Сухая фильтровальная бумага, заранее вымоченная в мирамистине | 7,1±0,5 | 14,7±0,4 |
| Сухая фильтровальная бумага | 0, сплошной рост | 0, сплошной рост |

Фильтровальная бумага, вымоченная в мирамистине, обладала такими же антибактериальными свойствами, как и пектиново-целлюлозная пленка, вымоченная в мирамистине. Это можно объяснить тем, что фильтровальная бумага обладает более сильными абсорбционными свойствами, чем целлюлозная пленка, имеющая гладкую текстуру.

Затем мы попытались выяснить, сохраняют ли пленки свои антибактериальные свойства после высушивания. Было установлено, что пектиново-целлюлозная пленка, заранее вымоченная в мирамистине и затем высушенная, имеет более сильное антибактериальное действие на рост *E. coli* и *S. epidermidis*, чем ее аналоги без пектина (см. табл. 1). Например, антибактериальный эффект сухой пектиново-целлюлозной пленки, заранее вымоченной в мирамистине, относительно культуры *E. coli*, выше на 30%, чем сухой целлюлозной пленки, также заранее вымоченной в мирамистине.

На основании данных диско-диффузионного метода показано, что пектиново-целлюлозная пленка, пропитанная хлоргексидином, обладает антибактериальным эффектом в отношении *E. coli* в 2 раза сильнее, чем обычная бактериальная целлюлозная пленка (рис. 4).

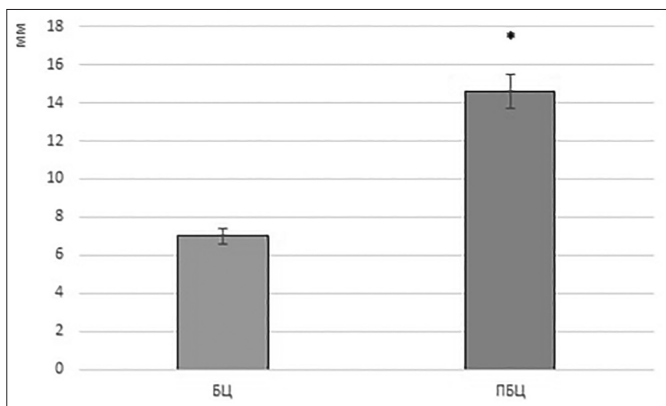


Рис. 4. Диаметр зоны подавления роста *E. coli* вокруг дисков из различных носителей, пропитанных хлоргексидином (БЦ — бактериальная целлюлозная пленка, ПБЦ — пектиново-целлюлозная пленка). Примечание: * — отличия диаметра зоны подавления роста *E. coli* вокруг дисков из пектиново-целлюлозной пленки (ПБЦ) от диаметра зоны подавления роста вокруг дисков из целлюлозной пленки (БЦ) достоверны с уровнем значимости $p < 0,05$

Увеличение антибактериальных свойств пектиново-целлюлозной пленки можно объяснить более лучшими впитывающими способностями, а также тем, что сама пектиново-целлюлозная пленка обладает слабым анти-

бактериальным действием, что было показано в предыдущих экспериментах.

Необходимо отметить появление антибактериальных свойств у пектиново-целлюлозной пленки, которых мы не наблюдали при воздействии фильтровальной бумаги и обычной целлюлозной пленки (см. табл.1). Это можно объяснить одним из известных свойств пектина — его антибактериальной активностью [8, 9, 14], которая сохраняется в составе целлюлозной пленки. Согласно полученным результатам, сухая пектиново-целлюлозная пленка, заранее вымоченная в мирамистине, имеет больший антибактериальный эффект, чем влажная пектиново-целлюлозная пленка. Возможно, это связано с совместным антибактериальным действием пектина и мирамистина, встроенного в пектиново-целлюлозную пленку за счет электростатических взаимодействий свободных карбоксильных групп пектина и мирамистина, который относится к группе катионных поверхностно-активных веществ.

Приобретенные свойства пектиново-целлюлозной пленки дадут возможность ее применения в медицине и дальнейших научно-исследовательских работах по получению новых композиционных материалов.

Заключение

Была получена пектиново-целлюлозная пленка на основе известного метода получения пленок бактериальной целлюлозы симбиотическими микроорганизмами *Medusomyces gisevii* при добавлении в среду культивирования яблочного пектина в концентрации 10 г/л. Концентрация пектина в среде после культивирования составила 0,5 г/л, что в 20 раз меньше содержания пектина в исходной питательной среде, что свидетельствует о внедрении пектина в целлюлозную пленку. При сравнении ИК-спектров бактериальных целлюлозных пленок с пектином и без него в интервале волновых чисел от 500 см^{-1} до 4000 см^{-1} отличия были обнаружены только в области волновых чисел $810\text{--}950 \text{ см}^{-1}$. Возможно, в структуре пектиново-целлюлозной пленки появляются транс-плоскостные двойные связи.

Были отмечены антибактериальные свойства пектиново-целлюлозной пленки в отношении культур *E. coli* и *Staph. epidermidis* по сравнению с пленками без пектина. Антибактериальный эффект сухой пектиново-целлюлозной пленки, заранее вымоченной в мирамистине, выше на 30%, чем сухой целлюлозной пленки, также заранее вымоченной в мирамистине. Антибактериальный эффект влажной пектиново-целлюлозной пленки, вымоченной в мирамистине, достоверно выше на 20%, чем влажной

целлюлозной пленки, вымоченной в мирамистине. Пектиново-целлюлозная пленка, вымоченная в мирамистине и затем высушенная, обладает большим антибактериальным эффектом, чем аналогичная ей пленка, но не высушенная. Пектиново-целлюлозная пленка, пропитанная 0,05% хлоргексидином, обладает антибактериальным эффектом в отношении *E. coli* в 2 раза сильнее, чем обычная бактериальная целлюлозная пленка.

Таким образом, пектиново-целлюлозная пленка является перспективным материалом для использования в качестве основы формирования раневых покрытий, косметических масок.

Литература

1. Альмова И.Х., Берикетов А.С., Инарокова А.М., Сабанчиева Ж.Х. Опыт применения пектина при заболеваниях, связанных с вредными факторами производства // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2014. — № 5–2. — С. 62–65.
2. Гашевская А.С. Потенциометрический и карбазольно-серный методы определения галактуроновой кислоты в растительных полисахаридах // Успехи современного естествознания. — 2016. — № 2. — С. 9–15.
3. Гладышева Е.К., Скиба Е.А. Биосинтез бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* // Вестник ВГУИТ. — 2015. — № 3(65). — С. 149–156.
4. Гладышева Е.К. Биосинтез бактериальной целлюлозы на ферментативном гидролизате лигниноцеллюлозного материала мискантуса // Фундаментальные исследования. — 2017. — № 9–2. — С. 290–294.
5. Гриненко Е.В., Рябухин Д.С., Васильев А.В. Инструментальные методы анализа органических соединений. Инфракрасная спектроскопия. Методические указания, контрольные вопросы и задачи для бакалавров направления 18.03.01 «Химическая технология» и 18.03.02 «Энерго-ресурсосберегающие процессы в химической технологии и биотехнологии». — СПб.: СПбГЛТУ, 2014. — 60 с.
6. Икласова А.Ш., Сакипова З.Б., Бекболатова Э.Н. Пектин: состав, технология получения, применение в пищевой и фармацевтической промышленности // Вестник КазНМУ. — 2018. — № 3. — С. 243–246.
7. Кленова Н.А. Лабораторный практикум по микробиологии: учебное пособие. — Самара: изд-во «Самарский университет». — 2012. — 69 с.
8. Лазарева Е.Б., Меньшиков Д.Д. Опыт и перспективы использования пектинов в лечебной практике // Антибиотики и химиотерапия. НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. — 1999. — Т. 44. — № 2. — С. 37–40.
9. Потиевский Э.Г., Дроздов В.Н. Антибактериальное действие пектина в эксперименте и клинике. — Омск. Изд-во Омской гос. мед. Академии. — 1997. — 96 с.
10. Сапунова Н.Б. и др. Получение бактериальной целлюлозы на среде с мелассой // Вестник технологического университета. — 2016. — Т. 19. — № 24. — С. 154–156.
11. Скворцова Э.Н., Громовых Т.И., Грачев В.С., Траскин В.Ю. Физико-химическая механика бактериальной целлюлозы // Коллоидный журнал. — 2019. — Т. 81. — № 4. — С. 441–452.
12. Фан М.Х. Биотехнология бактериальной целлюлозы с использованием штамма — продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008: специальность 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»: автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. — Москва, 2013. — 25 с.
13. Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование: теоретические основы и практикум. 3-е изд., перераб. и доп. — Самара: Самар. ун-т, 1996 (1997). — 266 с.
14. Хотимченко Ю.С., Кропотов А.В., Хотимченко М.Ю. Фармакологические свойства пектинов // Эфферентная терапия. — 2001. — Т. 7. — № 4. — С. 22–36.
15. Шарова Т.В., Васильева Т.И., Кленова Н.А., Языкова М.Ю. Способ получения композита пектиново-целлюлозной пленки на основе целлюлозы *Gluconacetobacter sucrofermentas* и пектина. Патент на изобретение №2726359 (РФ). — М., 2019.
16. Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reactions // Analytical Biochemistry. — 1962. — Vol. 4. — No. 4. — P. 330–334.
17. Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // Biochem. J. — 1954. — Vol. 58. — No. 2. — P. 345–352.
18. Schrecker S., Gostomski P. Determining the water holding capacity of microbial cellulose // Biotechnol. Lett. — 2005. — Vol. 27. — P. 1435–1438.
19. Taylor K.A., Buchanan-Smith J.G. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid // Analytical Biochemistry. — 1992. — Vol. 201. — No. 1. — P. 190–196.

References

1. Al'mova IKh, Beriketov AS, Inarokova AM, Sabanchiyeva ZhKh. Opyt primeneniya pektina pri zaboлевaniyakh, svyazannykh s vrednymi faktorami proizvodstva. Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy 2014; 5–2:62–65 (in Russian).
2. Gashevskaya AS. Potentsiometricheskiy i karbazol'no-sernyy metody opredeleniya galakturonovoy kisloty v rastitel'nykh polisakharidakh. Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya 2016; 2:9–15 (in Russian).
3. Gladysheva YeK, Skiba YeA. Biosintez bakterial'noy tsellyulozy kul'turoy *Medusomyces gisevii*. Vestnik VGUIT 2015; 3(65):149–156 (in Russian).
4. Gladysheva YeK. Biosintez bakterial'noy tsellyulozy na fermentativnom gidrolizate ligninotsellyuloznogo mate-

- riala miskantusa. Fundamental'nyye issledovaniya 2017; 9–2:290–294 (in Russian).
5. Grinenko YeV, Ryabukhin DS, Vasil'yev AV. Instrumental'nyye metody analiza organicheskikh soyedineniy. Infkrasnaya spektroskopiya. Metodicheskiye ukazaniya, kontrol'nyye voprosy i zadachi dlya bakalavrov napravleniy 18.03.01 «Khimicheskaya tekhnologiya» i 18.03.02 «Energoresursoberegayushchiye protsessy v khimicheskoy tekhnologii i biotekhnologii». St. Petersburg: SPbGLTU, 2014: 60 (in Russian).
 6. Iklasova ASH, Sakipova ZB, Bekbolatova EN. Pektin: sostav, tekhnologiya polucheniya, primeneniye v pishchevoy i farmatsevticheskoy promyshlennosti. Vestnik KazNMU 2018; 3:243–246 (in Russian).
 7. Klenova NA. Laboratornyy praktikum po mikrobiologii: uchebnoye posobiye. Samara: izd-vo «Samarskiy universitet», 2012: 69 (in Russian).
 8. Lazareva YeB, Men'shikov DD. Opyt i perspektivy ispol'zovaniya pektinov v lechebnoy praktike. Antibiotiki i khimioterapiya. NII skoroy pomoshchi im NV Sklifosovskogo 1999; 44(2):37–40 (in Russian).
 9. Potiyevskiy EG, Drozdov VN. Antibakterial'noye deystviye pektina v eksperimente i klinike. Omsk. Izd-vo Omskoy gos. med. Akademii, 1997: 96 (in Russian).
 10. Sapunova NB i dr. Polucheniye bakterial'noy tsellyulozy na srede s melassoy. Vestnik tekhnologicheskogo universiteta 2016; 19(24):154–156 (in Russian).
 11. Skvortsova ZN, Gromovykh TI, Grachev VS, Traskin VYu. Fiziko-khimicheskaya mekhanika bakterial'noy tsellyulozy. Kolloidnyy zhurnal 2019; 81(4):441–452 (in Russian).
 12. Fan MKh. Biotekhnologiya bakterial'noy tsellyulozy s ispol'zovaniyem shtamma – produtsenta Gluconacetobacter hansenii GH-1/2008: spetsial'nost' 03.01.06 «Biotekhnologiya (v tom chisle bionanotekhnologii)»: avtoref dis na soiskaniye uch st kand biol nauk. Moscow, 2013: 25 (in Russian).
 13. Frolov YuP. Matematicheskiye metody v biologii. EVM i programmirovaniye: teoreticheskiye osnovy i praktikum. 3-ye izd, pererab i dop. Samara: Samar un-t, 1996 (1997): 266 (in Russian).
 14. Khotimchenko YuS, Kropotov AV, Khotimchenko MYu. Farmakologicheskkiye svoystva pektinov. Efferentnaya terapiya 2001; 7(4):22–36 (in Russian).
 15. Sharova TV, Vasil'yeva TI, Klenova NA, YAzykova MYu. Sposob polucheniya kompozita pektinovo-tsellyuloznoy plenki na osnove tsellyulozy *Gluconacetobacter sucrofermentis* i pektina. Patent na izobreteniyе №2726359 (RF). Moscow, 2019 (in Russian).
 16. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reactions. Analytical Biochemistry 1962; 4(4):330–334.
 17. Hestrin S, Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. Biochem J 1954; 58(2):345–352.
 18. Schrecker S, Gostomski P. Determining the water holding capacity of microbial cellulose. Biotechnol Lett 2005; 27:1435–1438.
 19. Taylor KA, Buchanan-Smith JG. A colorimetric method for the quantitation of uronic acids and a specific assay for galacturonic acid. Analytical Biochemistry 1992; 201(1):190–196.

OBTAINING BACTERIAL PECTIN-CELLULOSE FILM AND STUDYING ITS PROPERTIES

T.V. SHAROVA, T.I. VASILYEVA, N.A. KLENOVA, P.A. PANOV

Samara National Research University named after Academician S.P. Korolev, Samara

A method has been developed by which a pectin-cellulose film was obtained based on the known method for producing bacterial cellulose films by symbiotic microorganisms *Medusomyces gisevii* when apple pectin is added to the cultivation medium at a concentration of 10 g/l. The antibacterial properties of the pectin-cellulose film against *E. coli* and Staph cultures were noted. epidermidis compared to films without pectin. The antibacterial effect of a dry pectin-cellulose film pre-soaked in Miramistin is 30% higher than that of a dry cellulose film also pre-soaked in Miramistin. Other effects based on this film have also been studied. It is believed that the pectin-cellulose film is a promising material for use as the basis for the formation of wound coverings, cosmetic masks.

Keywords: *Medusomyces gisevii* culture, cellulose pectin film, IR spectra, antibacterial activity.

Address:

Vasilyeva T.I., Ph.D.

associate professor of the department of biochemistry,
biotechnology and bioengineering, Samara National
Research University named after Academician S.P. Korolev
E-mail: vastaty@rambler.ru

Для цитирования:

Шарова Т.В., Васильева Т.И., Кленова Н.А., Панов П.А. Получение бактериальной пектиново-целлюлозной пленки и изучение ее свойств. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3):81–88.

For citation:

Sharova T.V., Vasilyeva T.I., Klenova N.A., Panov P.A. Obtaining bacterial pectin-cellulose film and studying its properties. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3): 81–88 (in Russian).

ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИВИРУСНОЙ СУБСТАНЦИИ L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ ИЗ ТРИХОДЕРМЫ

И.П. СМИРНОВА^{1*}, И.Г. БАШКИРОВА^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва,

²ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, г.о. Раменский, Московская область

Статья посвящена обзору технологий культивирования отечественного штамма-продуцента F-180 противоопухолевого и антивирусного фермента L-лизин- α -оксидазы из триходермы. Исследование представляет собой методическое и практическое руководство в поиске высокоактивных штаммов-продуцентов L-аминоксидаз грибного происхождения, в создании методов определения активности фермента, изучении условий и факторов, влияющих на его биосинтез, с целью получения культуральной жидкости продуцента с высокой L-лизин- α -оксидазной активностью. Прделанная работа послужила основой для создания технологического регламента биосинтеза фермента в полупромышленных условиях.

Ключевые слова: L-лизин- α -оксидаза, триходерма, биосинтез, регуляция, обзоры.

Достигнутые успехи в области создания лекарственных препаратов стали возможными благодаря комплексу работ, проведенных в области получения высокопродуктивных штаммов-продуцентов, и технологиям их культивирования, разработке простых и высокочувствительных методов определения биологически активных соединений, а также созданию высокоэффективных и экономически обоснованных производственных схем биосинтеза, выделения и получения чистых микробных ферментов, качество которых соответствует современным требованиям медицины и здравоохранения.

Особое место на современном этапе развития экспериментальной и клинической онкологии, в области химиотерапии лекарственных препаратов занимает использование ферментов бактериальной природы. Открытие специфического влияния L-аспарагиназы на рост лейкозных клеток стимулировало поиск и исследование ряда других ферментов бактериальной природы, расщепляющих заменимые и незаменимые аминокислоты или факторы, в которых опухолевые клетки нуждаются в большей степени, чем нормальные клетки [3, 4].

Впервые работами японских исследователей была показана способность гриба *Trichoderma viride* 244-2

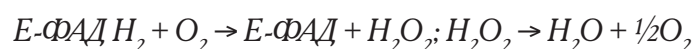
продуцировать фермент L-лизин- α -оксидазу (КФ 1.4.3.14), обладающую противоопухолевой активностью [35–37].

Оксидазы L-аминокислот катализируют реакцию окислительного дезаминирования α -аминогруппы L-аминокислот с образованием соответствующих кетокислот, аммиака и перекиси водорода. Они обнаружены у бактерий, а также у дрожжей и грибов и отнесены к группе флавиновых ферментов, не содержащих металла. Оксидазы L-аминокислот, источником которых является микроорганизмы, содержат ФАД [3].

Окислительное дезаминирование аминокислот протекает в две стадии.

Первая стадия является ферментативной и завершается образованием неустойчивого промежуточного продукта — иминокислоты, которая на второй стадии спонтанно, без участия фермента, но в присутствии воды, распадается на аммиак и α -кетокислоту.

Восстановленные флавиннуклеотиды оксидаз L-аминокислот непосредственно окисляются молекулярным кислородом, образуя перекись водорода, которая может подвергаться расщеплению под действием каталазы на воду и кислород:



По локализации α -аминоксидазы L-аминокислот микроорганизмов могут быть внутриклеточными и внеклеточными. Функции оксидаз L-аминокислот исследованы пока недостаточно. Например, считают, что

© 2023 г. Смирнова И.П., Башкирова И.Г.

* **Автор для переписки:**

Смирнова Ирина Павловна

д.б.н., профессор-консультант, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

E-mail: smir-ip@yandex.ru

внутриклеточные оксидазы L-аминокислот, являясь флавопротеинами, могут играть роль поставщиков электронов в дыхательную цепь. Показано, что окисление L-глутаминовой кислоты у *Azotobacter vinelandii* осуществляется в мембранах, сопряжено с функционированием электрон-транспортной системы [37].

Приоритетное место в исследованиях заняли оксидазы L-аминокислот с высокой субстратной специфичностью, катализирующие окисление не более одной-двух L-аминокислот. Особый интерес исследователей вызвала L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma*, впервые обнаруженная японскими исследователями, а затем на кафедре биохимии Российского университета дружбы народов (РУДН) был найден отечественный продуцент L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma harzianum* штамма ВКПМ F-180 [22].

Это послужило основанием для проведения исследований культивирования гриба с целью исследования его биологических свойств и, в первую очередь, в медицине в качестве перспективного противоопухолевого и антивирусного средства, а также практического использования фермента при создании биосенсора [25, 41, 43, 45, 46].

К настоящему времени оксидазная активность L-аминокислот найдена у большого числа прокариот и эукариот [29, 30, 32, 34, 35]. После обнаружения японскими исследователями противоопухолевой активности L-лизин- α -оксидазы в экстракте гриба *Tr. viride* штамма Y-244-2 внимание исследователей привлекло изучение оксидазной активности у ряда других грибов с целью изыскания специфических продуцентов оксидаз L-аминокислот. Повышенный интерес к этой группе эукариот объясняется тем, что они синтезируют экзофермент с высокой активностью и высокой термоустойчивостью.

Способность продуцировать оксидазы L-аминокислоты широко распространена среди грибов, однако исследований в этой области очень мало, и это, возможно, связано с тем, что продукты метаболизма грибов еще не нашли широкого применения в практике. Одной из причин ограниченного использования грибов в качестве продуцентов является возможность заsporения грибом используемой аппаратуры, что в дальнейшем затрудняет в ней культивирование других микроорганизмов. Другая, не менее важная причина, — это длительный цикл культивирования грибов, что в производстве биологически активных веществ малорентабельно.

В настоящее время интерес к оксидазам L-аминокислот остается достаточно высоким и привлекает внимание многих исследователей. В научной литературе появляются публикации как российских ученых, так и

зарубежных. Эти работы проводятся с использованием различных культур как не патогенных, так и патогенных. И хотя каждый исследователь придерживается своих целей и задач работы, тем не менее в целом они расширяют наши знания об этих ферментах и важности их практического использования [25, 28–33, 38, 39, 41].

Поскольку первоочередной задачей любого исследования является получение исходной субстанции в достаточном количестве, мы посчитали необходимостью представить результаты многолетних исследований биосинтеза и регуляции фермента L-лизин- α -оксидазы из триходермы на примере штамма *Tr. harzianum* штамма ВКПМ F-180.

Впервые работами японских исследователей была показана способность гриба *Tr. viride* 244-2 продуцировать фермент L-лизин- α -оксидазу, обладающую противоопухолевой активностью [35, 37]. В отечественной литературе в 1980-х годах отсутствовали сведения об образовании этого фермента грибами рода *Trichoderma*.

Род грибов *Trichoderma* — один из наиболее изучаемых грибов в настоящее время. Это единственный род, каждый вид которого представлен в Генетическом Банке одним геном, а многие виды представлены последовательностью двух или более генов. Такой повышенный интерес к этому роду грибов обусловлен его практической и экологической значимостью.

Поиск продуцентов оксидаз L-аминокислот основан на выборе продуцента с высокой исходной активностью и с более коротким циклом развития, а также, как уже упоминалось, с высокой специфичностью фермента, что диктуется в основном возможным практическим использованием их в медицине в составе ферментных анализаторов с целью определения аминокислот. Поэтому при поиске активного продуцента важно выяснить, помимо его действия в отношении выбранной аминокислоты, какова его оксидазная активность в отношении других L-аминокислот. При этом необходимо учитывать, что действие фермента происходит в многокомпонентной системе и возможно присутствие различных оксидаз, оптимум действия которых проявляется в разном диапазоне значений pH [12, 14–16, 27, 44].

На кафедре биохимии РУДН под руководством академика РАМН Березова Т.Т. впервые был начат поиск отечественного продуцента L-лизин- α -оксидазы среди грибов рода *Trichoderma*. В исследуемой коллекции культур рода *Trichoderma* способность к образованию L-лизин- α -оксидазы обнаружена у 5 из 18 изученных штаммов следующих видов: *Tr. viride* (2 штамма), *Tr. harzianum*, *Tr. aureoviride*, *Tr. longibrachiatum*. Макси-

мальная активность фермента отмечена для *Tr. harzianum* штамм ВКПМ F-180, *Tr. aureoviride* ВКПМ-2027. Изучение спектра оксидазных активностей культур, способных расти на среде с пшеничными отрубями, показало, что штаммы, не образующие L-лизин- α -оксидазу, в отношении деструкции других L-аминокислот оксидазной активности не проявляют. Нами были проведены углубленные исследования активных штаммов-продуцентов фермента L-лизин- α -оксидазы. Установлено, что различные штаммы *Trichoderma* обладают разной субстратной специфичностью в отношении деструкции L-аминокислот при разном значении pH. Однако наибольшую оксидазную активность они проявляли в отношении окислительного дезаминирования L-лизина [3, 22]. Более перспективными для использования в промышленных условиях биологически активных соединений являются штаммы с коротким циклом развития на всех стадиях биотехнологического процесса.

Следующим этапом был выбор штамма-продуцента фермента L-лизин- α -оксидазы с узким спектром субстратной специфичности: высокой активностью в отношении деструкции L-лизина и вызывающим деструкцию наименьшим количеством L-аминокислот. С целью изучения субстратной специфичности к природным L-аминокислотам были отобраны культуры с активным ростом на твердой питательной среде с отрубями (среде Soda). Окислительное дезаминирование L-аминокислот обнаруживается у разных штаммов по-разному в зависимости от возраста культуры. Так, у культуры *Tr. harzianum* Rifai F-180 L-фенилаланин- α -оксидазная активность проявляется на третьи сутки биосинтеза гриба и увеличивается почти в 9 раз к восьмым суткам роста культур [14]. Определение оптимальных сроков биосинтеза фермента необходимо не только для установления сроков окончания ферментации, но и для установления полученного спектра оксидазных активностей исследуемой культуры.

Однако следует отметить, что культуры, относящиеся к одному и тому же виду, не всегда проявляют одинаковую активность в отношении деструкции L-аминокислот. Так, среди штаммов *Tr. viride* обнаружены как высокоактивные штаммы, так и штаммы, не синтезирующие фермент L-лизин- α -оксидазу [22].

При изучении скорости роста различных штаммов на среде с пшеничными отрубями и определении ферментативной активности водного экстракта грибов не было найдено корреляции между ними. Так, например, культура *Tr. lignorum* хорошо росла на пшеничных отрубях, однако L-лизин- α -оксидазная активность у этой культуры отсутствовала [22].

С целью получения исходного продуцента с высокой L-лизин- α -оксидазной активностью для дальнейшего испытания в качестве противоопухолевого препарата нами была исследована коллекция культур грибов различных родов. Однако в наших опытах среди изученных культур грибов наибольшую L-лизин- α -оксидазную и высокую субстратную специфичность в отношении L-лизина проявлял штамм *Tr. harzianum* Rifai F-180. В то же время некоторые культуры грибов, хотя и обладали L-лизин, L-метионин- и L-лейцин- α -оксидазными активностями, однако обнаруживали активность меньшую по сравнению с L-лизин- α -оксидазной активностью у вышеуказанного штамма.

Нами было впервые проведено углубленное исследование коллекции культур, относящихся к различным родам несовершенных грибов, на способность продуцировать оксидазы L-аминокислот. Найдены высокоактивные продуценты, а сравнительное изучение субстратной специфичности различных активных штаммов-продуцентов фермента рода *Trichoderma* позволило выделить штамм *Tr. harzianum* Rifai F-180, что послужило основанием использовать его в дальнейшей работе в качестве продуцента L-лизин- α -оксидазы. Кроме того, штамм проявлял высокую активность в более ранние сроки культивирования по сравнению с другими штаммами, что служит важным фактором для выбора в экономическом отношении.

В литературе имеются сведения японских исследователей о субстратной специфичности штамма-продуцента L-лизин- α -оксидазы *Tr. viride* Y-244-2 (в % по отношению к деструкции L-лизина): L-лизин – 100%, L-фенилаланин – 5,9%, L-аргинин – 4,3%, L-гистидин – 3,6%. Субстратная специфичность фермента, образуемого штаммом *Tr. harzianum* Rifai F-180, как было показано, проявляется в соотношениях: L-лизина – 100%, L-фенилаланина – 5,0%, L-метионина – 1,2% [34].

Стратегия и тактика поиска высокоактивного продуцента L-лизин- α -оксидазы невозможна без разработки метода определения активности фермента. Нами разработаны высокочувствительные и вместе с тем простые методы определения активностей L-лизин- α -оксидазы, L-фенилаланин- α -оксидазы и L-метионин- α -оксидазы. Это дало возможность провести у исследованных штаммов грибов определение активности сопутствующих оксидаз L-аминокислот [12, 14, 21], а также модификацию ранее предложенного спектрофотометрического метода определения активности фермента, заключающегося в замене канцерогенного хромогена ортодианизидина на зна-

чительно более безопасный реактив ортофенилендиамин. Кроме того, было сокращено время проведения анализа, увеличена чувствительность метода и воспроизводимость результатов. В последние годы был использован более упрощенный метод определения активности L-лизин- α -оксидазы [40].

Известно, что более высокая активность образования ферментов грибами достигается комбинированием методов использования генетических особенностей продуцента и физиологических методов культивирования, способствующих индукции соответствующих ферментов.

Морфологические особенности грибов — апикальный рост, разделенный во времени, синтез различных слоев клеточной оболочки в делящейся верхушечной клетке и преапикальной зоне, разная их метаболическая активность обуславливают неоднородность клеток мицелия и конидии грибов. В связи с этим локализация отдельных ферментов в структурных элементах клетки, органеллах, а также способность выхода их из клетки гриба неодинаковы в зависимости от штамма-продуцента, его возраста, способа и условий культивирования [2, 7].

Биосинтез продуктов микробного происхождения, в том числе ферментов, можно увеличить физиологическими методами, характеризующимися большой стабильностью и надежностью полученных результатов, быстротой осуществления и экономичностью. Для этих целей необходимо знание оптимальных условий синтеза фермента, физиологического значения соответствующего процесса для продуцента, а также путей синтеза данного метаболита.

Подбор оптимальных условий ферментации проводят, обычно варьируя только один изучаемый фактор, при сохранении других на постоянном уровне. Успешное управление образованием продуктов сводится к такому вмешательству в метаболизм, регуляция которого приводит к повышенному образованию желаемого продукта. Одним из наиболее распространенных методов регуляции синтеза ферментов является подбор оптимального состава питательной среды [24, 26].

Очередной задачей исследования культивирования L-лизин- α -оксидазы триходермой был выбор способа культивирования, который существенно влияет на величину и динамику накопления фермента. При сопоставлении величин L-лизин- α -оксидазной активности при различных способах культивирования было установлено, что максимум образования фермента при глубинном способе культивирования происходит на 5-е, а не на 8-е сутки, как это имеет место при поверхностном способе выращивания [16]. Удельная активность фермента при

глубинном культивировании также была выше. Однако в литературе имеются сведения, что некоторые ферменты могут быть синтезированы лишь при определенном способе культивирования. Так, японскими исследователями было показано, что L-лизин- α -оксидаза в культуре гриба *Tr. viride* может быть синтезирована только при поверхностном культивировании продуцента [26].

Нашими исследованиями было продемонстрировано, что при различных способах культивирования (поверхностном и глубинном) у представителей рода *Trichoderma* процессы спорообразования протекают неодинаково [27]. Была констатирована морфологическая редукция спор при глубинном способе выращивания по сравнению с поверхностным способом. Однако установленная нами корреляция между процессом спорообразования *Trichoderma* и биосинтезом фермента служит косвенным доказательством преимущества поверхностного способа выращивания *Tr. harzianum*, при котором создаются оптимальные условия образования спор. Фактор, определяющий выбор способа выращивания штамма-продуцента биосинтеза L-лизин- α -оксидазы в промышленных условиях, — это экономически выгодный короткий цикл развития гриба при глубинном культивировании [12, 44].

Максимальная интенсивность накопления ферментов начинается по окончании стадии интенсивности роста культуры. С физиологической точки зрения это означает, что расход ферментов на разложение органических веществ среды снижается и их избыток накапливается в среде [2, 7].

Продолжительность культивирования грибов зависит от многих факторов и складывается из продолжительности отдельных стадий роста гриба. Для представителей рода *Trichoderma* известно, что активный их рост прекращается после 4 суток; при этом оптимальная температура для всех представителей лежит в пределах 24–30 °С. Полный цикл и образование конидиального спороношения у видов рода *Trichoderma* совершается в течение 3 суток [7].

Для японского штамма *Tr. viride* Y-244-2 показано, что максимальное образование L-лизин- α -оксидазы происходит на 10–14-е сутки роста поверхностного выращивания на среде Soda [34]. Нами была изучена динамика образования данного фермента *Tr. harzianum* Rifai F-180 на указанной среде. Наибольшее количество фермента образовывалось на 8-е сутки роста микроорганизма [14].

Однако для технологического процесса получения конечного продукта более экономична технология продуцента с меньшим сроком культивирования. Сокраще-

ние срока выращивания гриба оказалось важным еще и потому, что субстратная специфичность по отношению к природным L-аминокислотам, как было нами показано для данного штамма, выше в более ранние сроки культивирования гриба.

Многочисленные литературные данные показывают, что условия, влияющие на рост микроорганизма и образование фермента, зависят от соотношения основных источников питания: углерода (C) и азота (N).

Безусловно, нельзя сделать какого-либо общего вывода об оптимальном соотношении C/N в среде для синтеза физиологически активного вещества. По-видимому, соотношение это будет зависеть не только от самого продуцента, его видовой особенности, возраста, но и от многих других факторов: природы источников азота и углерода, состава образуемых ферментных комплексов, режима культивирования, макро- и микроэлементов. Но вместе с тем нахождение этого оптимального соотношения C/N в среде для каждого конкретного случая необходимо в целях максимального выхода получаемого фермента.

В работах японских исследователей было найдено влияние различных углеводов на качество добавок в основную питательную среду Soda на образование *Tr. viride* L-лизин- α -оксидазы. При использовании в качестве добавок углеводов в концентрации 4 г/100 г среды нами было отмечено незначительное увеличение биосинтеза фермента при добавлении в среду мальтозы, сахарозы и лактозы. Результаты наших экспериментов по изучению влияния различных углеводов в качестве добавок на образование L-лизин- α -оксидазы *Tr. harzianum* Rifai F-180 показали незначительное увеличение биосинтеза фермента при внесении в среду ксилулозы и лактозы. Пшеничные отруби служат достаточно хорошим источником углерода для *Trichoderma* [15, 34].

Растительные материалы, в том числе и пшеничные отруби, резистентны к действию различных гидролизующих агентов. Это обусловлено их нерастворимостью, высокой степенью кристалличности природной целлюлозы, наличием защитной матрицы, образованной лигнином и гемицеллюлозой, в которую погружены целлюлозные волокна.

Размер пор лигнифицированных тканей растений малы для прохождения ферментов. Однако использование питательной среды с подобными субстратами в качестве источников углерода вполне допустимо.

Предварительная стерилизация среды с пшеничными отрубями, которая происходит при повышенном давлении и высокой температуре, приводит субстрат в более доступную для использования грибами форму. По-видимому, пшеничные отруби, в составе которых много

целлюлозы, являются более подходящим источником углерода для биосинтеза фермента триходермой. И это вполне понятно, так как в естественных условиях обитания в почве представители данного рода утилизируют целлюлозосодержащие растительные остатки, как бы адсорбируясь на них. Не исключено, что адгезия мицелия гриба на пшеничных отрубях способна изменять интенсивность и направленность физиолого-биохимических процессов, осуществляемых триходермой. В результате такой иммобилизации возможно значительное изменение проницаемости клеточных стенок [9, 11, 44].

Японскими исследователями Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H. и Soda K. было изучено влияние неорганических источников азота на биосинтез L-лизин- α -оксидазы *Tr. viride* Y-244-2. Исследователями был сделан вывод, что наилучшей формой для образования фермента является нитратная форма. Нами было проведено изучение влияния различных источников азота на образование этого фермента *Tr. harzianum* Rifai F-180. Используемые добавки в среду выращивания гриба источники азота были уравновешены по содержанию азота в солях. В отличие от японского штамма, отечественный штамм *Tr. harzianum* Rifai F-180 хорошо усваивает и аммонийные формы азота. Использование в качестве источника азота NH_4Cl оказалось менее эффективно. Максимальный эффект влияния на биосинтез L-лизин- α -оксидазы грибом дает прибавление $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ к твердой питательной среде с пшеничными отрубями. Исследование влияние добавок различных концентраций этой соли позволило определить оптимальные условия биосинтеза фермента (0,65–1,30 г/100 г среды). Изучение динамики образования L-лизин- α -оксидазы на среде с использованием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в качестве источника азота показало, что наибольшее образование фермента наблюдается на 6-е сутки, что позволило сократить срок культивирования *Trichoderma* на этой среде на 2 суток по сравнению со сроком выращивания на среде Soda [34].

Промышленное использование какого-либо физиологически активного вещества микроорганизма зависит, главным образом, от экономичной технологии процесса производства, от таких общеизвестных факторов, как инокулят, pH среды, аэрация, температура культивирования микроорганизма, и даже от режима автоклавирования исследуемой среды.

В процессе разработки условий глубинного культивирования гриба *Tr. harzianum* нами было изучено влияние режима автоклавирования среды на активность фермента L-лизин- α -оксидазы *Tr. harzianum* Rifai F-180. Отмечено, что для выращивания *Tr. harzianum*

с целью повышения L-лизин- α -оксидазы активности необходимо автоклавировать среду пшеничных отрубей при 1 атмосфере 1 час. Важнейшее значение для биосинтеза L-лизин- α -оксидазы в условиях глубинного культивирования имеет качество инокулята. Нами при изучении влияния инокулята *Tr. harzianum* в условиях глубинного культивирования была установлена наибольшая ферментативная активность L-лизин- α -оксидазы с использованием вегетативного мицелия по сравнению с использованием только спор. Наиболее высокая активность фермента при глубинном культивировании обнаруживалась при использовании в качестве инокулята 20 г мицелия гриба (с отрубями), а использование инокулята в виде спор гриба приводило к снижению роста культуры и биосинтеза L-лизин- α -оксидазы [7].

Оптимальный рН среды служит одним из важных факторов, определяющих нормальный рост *Trichoderma* и ее биосинтетические возможности. При изменении его в неблагоприятную сторону микроорганизм перестает расти даже в тех случаях, если все остальные условия являются оптимальными. Изменение рН среды влияет на накопление конечных продуктов обмена веществ в культуральной жидкости *Trichoderma*. Например, штамм-продуцент L-лизин- α -оксидазы может расти и развиваться в довольно широком диапазоне рН — от 4 до 8, однако синтез фермента идет лишь при исходном значении рН среды — 5,6–6,0. При смещении рН среды в кислую сторону гриб образует мощную биомассу, но величина активности фермента остается на чрезвычайно низком уровне. В связи с этим особое значение приобретает используемый источник азота [26].

Известно, что специфическими активаторами при индуцированном синтезе ряда ферментов являются субстраты этих ферментов и их аналоги. Образование фермента после добавления индуктора к культуре — продуценту начинается уже через несколько минут и осуществляется с повышенной скоростью (в 2–3 раза выше базальной) до тех пор, пока в среде присутствует индуктор. В большинстве случаев удаление индуктора из среды практически приводит к снижению скорости синтеза индуцируемого фермента до исходного уровня. Важной особенностью индукции являются ее множественность и координированность, так как индуктор может одновременно вызывать синтез группы ферментов, участвующих в превращениях одного вещества через серию промежуточных продуктов реакции, — так называемый процесс «серийной индукции». Подбор индуктора L-лизин- α -оксидазной активности в культуре продуцента мы проводили с учетом тех немногих данных, которые имелись в литературе, а также

принимая во внимание то, что испытываемый синтез-стимулирующий фактор должен быть достаточно доступным, чтобы быть рекомендованным для совершенствования технологии получения L-лизин- α -оксидазы в производственных условиях.

Нами были изучены различные факторы регуляции ферментативной активности, такие как модификация питательной среды, использование в процессе ферментации посевного материала различного возраста и физиологического состояния, физико-химические факторы культивирования (освещенность и электростатическое поле), а также биологически активные добавки к ферментационной среде. Такое разнообразие методов физиологического подхода к регуляции биосинтеза и активности ферментов свидетельствует о широких возможностях научного поиска в этом направлении. Физиологические методы управления микробным метаболизмом не только безопасны, но и естественны, так как не предполагают изменения генотипа штамма-продуцента.

Было показано, что многие из изученных факторов оказывают в той или иной степени влияние на величину и динамику накопления противоопухолевого фермента в культуре *Tr. harzianum* Rifai F-180, однако наиболее высокая активность фермента (в 2–3 раза превышающая контрольные величины), выявлялась при добавлении в ферментационную среду стерильной культуральной жидкости *Brevibacterium* sp. — продуцента L-лизина. Обнаруженный синтез-стимулирующий эффект представлял интерес не только в прикладном отношении, но и в теоретическом плане, поэтому был изучен более подробно в последующих исследованиях [19, 20].

Оказалось, что биостимулятор бактериального происхождения вызывает не только повышение L-лизин- α -оксидазной активности у штамма-продуцента в среднем в 2,7 раза, L-фенилаланин- α -оксидазной активности — в 11 раз, L-метионин- α -оксидазной активности — в 80 раз. Не менее интересно, что под действием биостимуляторов обнаруживаются новые, ранее не открытые оксидазные активности в отношении L-изомеров тирозина, аргинина, лейцина и гистидина. Для каждой из изучаемых оксидазных активностей, выявляющихся при добавлении биостимулятора, были определены оптимальные значения рН инкубационной смеси. При этом было показано существование двух оптимальных значений рН для их проявления — 5,8 и 8,4.

Механизм действия биостимуляторов, вероятнее всего, является комплексным: он включает в себя ряд биохимических и физиологических аспектов, в частности, индукцию биосинтеза L-лизин- α -оксидазы

L-аминокислотами и другими продуктами жизнедеятельности бактерий, связанную с удовлетворением трофических потребностей гриба в низкомолекулярных азотсодержащих соединениях, проявлением его антагонистических свойств, стимулированием процессов роста, развития гриба и вступлением продуцента в фазу конидиеобразования, связанную с автолизом мицелия и увеличением активности L-лизин- α -оксидазы. В прикладном отношении наиболее важным результатом проведенных экспериментов служит увеличение исходной L-лизин- α -оксидазной активности в 2,7 раза с помощью дешевых и легкодоступных ингредиентов питательной среды [19, 20].

Исследование механизмов регуляции биосинтеза и активности практически важного фермента является необходимым условием для успешного управления метаболизмом соответствующего продуцента. В литературе почти нет сведений о механизмах регуляции биосинтеза и активности оксидаз L-аминокислот из грибов, за исключением единичных работ [15, 16, 34].

На заключительном этапе проведенных исследований были разработаны два новых варианта выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma*: хроматографический метод, включающий в себя осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ хроматографию на DEAE-сефацелле с последующей хроматографией на Сефадексе G-100 (удельная активность гомогенного фермента составляет 292 Ед /мг), и мембранный метод, основанный на использовании наноструктурированных мембран. Созданное новое мембранное устройство было апробировано при выделении и очистке L-лизин- α -оксидазы. Выделение и очистку осуществляли методом последовательной четырехступенчатой мембранной фильтрации с мембранами с размером пор от 0,2 мкм до массы 30 kDa. Чистоту препарата проверяли методом капиллярного электрофореза [23]. Ранее данная система использовалась для решения задач аналитической химии и для проведения очистки L-лизин- α -оксидазы применялась впервые. Предложенные технологии выделения и очистки фермента расширяют возможности для производителя получения конечного продукта.

Нами впервые исследована стабильность культуральной жидкости *Tr. harzianum* Rifai F-180 длительного хранения, полученной при культивировании на оборудовании Опытной технологической установки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (г. Пущино). Результаты исследований доказали стабильность активности L-лизин- α -оксидазы в процессе семилетнего хранения при температуре 4 °С и тем самым возможность использования

культуральной жидкости не только с целью накопления для получения гомогенного фермента, но и на перспективу использования ее в новых областях практического применения [9].

Проведенный комплекс исследований аспектов культивирования L-лизин- α -оксидазы штамма *Tr. harzianum* Rifai F-180 позволил создать совместно с сотрудниками Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН «Технологический регламент по изготовлению ферментного препарата лизиноксидазы» [23].

Фермент L-лизин- α -оксидаза из *Trichoderma harzianum* Rifai F-180, являясь ингибитором ряда опухолей, вирусных инфекций человека, может найти широкое применение в практике не только как лекарственный препарат, но и как средство в борьбе с опасными заболеваниями растений, а также в биосенсорах для определения концентрации L-лизина в кормах и продуктах питания [1, 5, 6, 8, 10, 13, 17, 18, 40–42, 45, 46].

Литература

1. Алексеев С.Б., Селищева А.А., Смирнова И.П., Подборонов В.М., Иванова А.А. Перспективы терапии онкологических заболеваний L-лизин- α -оксидазой триходермы // Международный ж-л по иммунореабилитации. — 2010. — Т. 12. — № 2. — С. 164–165.
2. Беккер Э.Э. Физиология грибов и их практическое использование. — Изд.-во Моск. гос. ун-та, 1983.
3. Березов Т.Т. Биохимические основы энзимотерапии опухолей. Актовая речь. — М., Изд.-во УДН, 1989. — С. 4–12.
4. Березов Т.Т. Ферментная терапия опухолей // Вестник АМН СССР. — 1984. — № 8. — С. 11–24.
5. Березов Т.Т., Смирнова И.П., Алексеев С.Б., Згурский А.А., Диордица С.В., Анджарапидзе О.Г. Ингибитор вируса герпеса простого I типа. Патент РФ № 2022012, опубл. 30.10.1994.
6. Березов Т.Т., Хадуев С.Х., Трещалина Е.М., Фирсова Г.А., Седакова А.А., Уманский Б.Ю., Диджапетрев Я.К., Лукашева Е.В., Смирнова И.П. и др. Фермент, обладающий антипролиферативной и антиметастатической активностью. Авторское свидетельство СССР № 1660387, опубл. 1991.
7. Горленко М.В. О некоторых направлениях эволюции фитопатогенных грибов // Микол. и фитопатол. — 1995. — Т. 25. — Вып. 1. — С. 87–94.
8. Ларичев В.Ф., Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А. Активность L-лизин- α -оксидазы из триходермы на модели вируса клещевого энцефалита // Проблемы медицинской микологии. — 2016. — Т. 18. — № 2. — С. 86.
9. Пакина Е.Н., Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П. Биологическая и биохимическая стабильность метаболитов са-

- профитного гриба *Trichoderma harzianum* Rifai // Вестник РУДН, серия агрономия. — 2009. — № 4. — С. 28–33.
10. Раковская И.В., Смирнова И.П. Антимикоплазменная активность культуральной жидкости триходермы // Проблемы медицинской микологии. — 2016. — Т. 18. — № 2. — С. 108.
 11. Смирнова И.П. Продукенты оксидаз L-аминокислот и возможные области их применения // Биотехнология. — 1991. — № 3. — С. 3–7.
 12. Смирнова И.П., Алексеев С.Б. Биосинтез противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma* sp. // Антибиотики и химиотерапия. — 2009. — Т. 54. — № 5–6. — С. 8–11.
 13. Смирнова И.П., Алексеев С.Б., Мошков Д.А. Триходерма — продуцент ингибитора вируса иммунодефицита человека // Вопросы медицинской химии. — 2000. — № 4. — С. 384–387.
 14. Смирнова И.П., Березов Т.Т. Изучение субстратной специфичности оксидаз L-аминокислот некоторых штаммов рода *Trichoderma* sp. // Микробиология. — 1989. — Т. 58. — № 1. — С. 49–53.
 15. Смирнова И.П., Березов Т.Т. Факторы регуляции L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp. // Микробиология. — 1987. — № 4. — С. 708–710.
 16. Смирнова И.П., Березов Т.Т., Хадуев С.Х. Зависимость образования антиопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы грибом *Trichoderma* sp. от условий культивирования / Сб. энзимология опухолей. — М., Изд.-во УДН, 1985. — С. 73–77.
 17. Смирнова И.П., Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А. Антибактериальная активность L-лизин- α -оксидазы из триходермы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2017. — Т. 163. — № 6. — С. 743–746.
 18. Смирнова И.П., Ларичев В.Ф. Ингибитор вируса клещевого энцефалита. Патент РФ № 2473689, опубл. 27.01.2013. Бюл. № 3.
 19. Смирнова И.П., Потапова О.Л. Индукция синтеза оксидаз L-аминокислот биостимуляторами бактериального и грибного происхождения // Биотехнология. — 1991. — № 2. — С. 25–26.
 20. Смирнова И.П., Потапова О.Л., Лаугалене Н.Ф., Веса В.С., Быкова О.М. Изучение некоторых каталитических свойств индуцированной L-лизин- α -оксидазы // Вопр. мед. химии. — 1992. — № 1. — С. 9–13.
 21. Смирнова И.П., Сяткин С.П., Березов Т.Т. Спектрофотометрический метод определения L-лизин- α -оксидазы // Вопр. мед. химии. — 1984. — № 1. — С. 133–136.
 22. Смирнова И.П., Хадуев С.Х. L-лизин- α -оксидазная активность некоторых видов *Trichoderma* // Микробиология. — 1984. — № 1. — С. 163–164.
 23. Смирнова И.П., Шкинев В.М., Руднев А.В., Шнейдер Ю.А., Кузовников А.Е. Технологии выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы // Биотехнология. — 2010. — № 6. — С. 52–60.
 24. Смирнова И.П., Шнейдер Ю.А. Гемидцеллюлозный субстрат-индуктор биосинтеза L-лизин- α -оксидазы триходермой // Вестник РУДН, серия агрономия. — 2010. — № 1. — С. 20–26.
 25. Хадуев С.Х., Глазкова Т.Ю., Веса В.С., Лаугалене Н.Ф., Пуоджюте С.П., Денис Г.И., Юрченко Н.Я., Березов Т.Т. Оценка противолейкозной активности L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma* sp. в химиотерапевтических опытах // Бюлл. эксперимент. биол. и медицины. — 1989. — № 10. — С. 476–477.
 26. Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П. Определение оптимального состава среды для биосинтеза L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma harzianum* Rifai // Проблемы медицинской микологии. — 2011. — Т. 13. — № 2. — С. 123.
 27. Шнейдер Ю.А., Хомик А.А., Кишмахова Л.М., Смирнова И.П. Культивирование сапрофитного гриба триходермы и биосинтез L-лизин- α -оксидазы // Вестник РУДН, серия агрономия. — 2010. — № 4. — С. 49–55.
 28. Alexandre F.R., Pantaleone D.P., Taylor P.P., Fotheringham I.G., Ager D.J., Turner N.J. Amine-boranes: effective reducing agents for the deracemisation of dl-amino acids using l-amino acid oxidase from *Proteus myxofaciens* // Tetrahedron Letters. — 2002. — Vol. 43. — No. 4:707–710.
 29. Arima J., Sasaki C., Sakaguchi C., Mizuno H., Tamura T., Kashima A., ... & Inagaki K. Structural characterization of l-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6 // The FEBS journal. — 2009. — Vol. 276. — No. 14:3894–3903.
 30. Faust A., Niefind K., Hummel W., Schomburg D. The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation // Journal of molecular biology. — 2007. — Vol. 367. — No. 1:234–248.
 31. Fuller J.J., Ropke R., Krausz J., Rennhack K.E., Daniel N.P., Blankenfeldt W., ... & Moser J. Biosynthesis of violacein, structure and function of l-Tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum* // Journal of Biological Chemistry. — 2016. — Vol. 291. — No. 38:20068–20084.
 32. Gomez D., Espinosa E., Bertazzo M., Lucas-Elío P., Solano F., Sanchez-Amat A. The macromolecule with antimicrobial activity synthesized by *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strains is an L-amino acid oxidase // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2008. — Vol. 79:925–930.
 33. Kondo H., Kitagawa M., Matsumoto Y., Saito M., Amano M., Sugiyama S., ... & Imada K. Structural basis of strict substrate recognition of L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride* // Protein Science. — 2020. — Vol. 29. — No. 11:2213–2225.
 34. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Misono H., Soda K. A new antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride* // J. Bio. Chem. — 1980. — Vol. 255. — No. 3. — P. 976–981.
 35. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Soda K. Effect of L-lysine- α -oxydase on youth of mouse leukemic cells // Agr. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 44:387–393.

36. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Soda K. Extracellular production of L-lysine- α -oxidase in wheat bran culture of a strain of *Trichoderma viride* // Agric. Biol. Chem. — 1979. — Vol. 43. — No. 12. — P. 2531–2533.
37. Kusakabe H., Midorikawa Y., Fujishima T., Kuninaka A., Yoshino H. Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran // Agric. Biol. Chem. — 1983. — Vol. 47:1323–1328.
38. Nakano S., Niwa M., Asano Y., Ito S. Following the evolutionary track of a highly specific L-arginine oxidase by reconstruction and biochemical analysis of ancestral and native enzymes // Applied and Environmental Microbiology. — 2019. — Vol. 85. — No. 12. — e00459–19. doi: 10.1128/AEM.00459-19.
39. Pokrovsky V.S., Lukashov A.N., Babayeva G., Karshieva S.S., Arinbasarova A.Y., Medentzev A.G., ... & Lukashova E.V. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* RIFAI VKM F-4268D in mice // Amino Acids. — 2021. — Vol. 53:111–118.
40. Senyagin A.N., Larichev V.F., Smirnova I.P., Podoprigrora I.V. A novel express method to determine activity of antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2020. — Vol. 169. — No. 1:119–121.
41. Shkinev V., Maksimova V., Mokhodoeva O., Larichev V., Spivakov O., Osmolovskaya B., Egorova A., Smirnova I., Dzhenloda R. Nanosized magnetite modified with poly(ethylene glycol) for efficient sorption of L-lysine- α -oxidase from the culture fluid // Elsevier, Materials Letters. — 2022. — Vol. 323. — Art. 132535. doi: 10.1016/j.matlet.2022.132535.
42. Smirnova I.P., Karimova E.V., Shneider Yu.A., Volina E.G. L-lysine- α -oxidase: *Acidovorax citrulli* bacterium inhibitor // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. Immunology and Microbiology. — 2018. — Vol. 164. — No. 4:459–461.
43. Smirnova I.P., Kuznetsov V.I., Podoprigrora I.V., Mansur T.I., Senyagin A.N., Bashkirova I.G. Characterization of L-lysine- α -oxidase, a new antitumor and antiviral drug substance synthesized by *Trichoderma*: Life sciences-chemical // International Journal of Life science and Pharma Research. — 2022. — Vol. 12. — Sp.Iss. 23:L15–20. doi: 10.22376/ijpbs/lpr.2022.12.6.SP23.L15-20.
44. Smirnova I.P., Kuznetsova O.M., Botin A.S., Siatkin S.P., Kuznetsov V.I., Myandina G.I., Nurmuradov M.K. Amino oxidase activities of antitumor enzyme producer from *Trichoderma* // Drug Invention Today. — 2019. — Vol. 11. — No. 3:758–762.
45. Smirnova I.P., Podoprigrora I.V., Kuznetsov V.I., Mansur T.I., Bashkirova I.G., Das M.S. Definitions of antibodies to the antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase, the study of its immunogenic properties and allergenic activity // Revista Latinoamericana de Hipertensión. — 2021. — Vol. 16. — No. 1:56–67.
46. Smirnova I.P., Podoprigrora I.V., Kuznetsov V.I., Mansur T.I., Miandina G.I., Iashina N.V. New *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 — L-lysine- α -oxidase antitumor enzyme producer — culture liquid-based substance biotechnology // Sys. Rev. Pharm. — 2020. — Vol. 11(11):203–207.

References

1. Alekseyev SB, Selishcheva AA, Smirnova IP, Podboronov VM, Ivanova AA. Perspektivy terapii onkologicheskikh zabol-evaniy L-lizin- α -oksidazoy trikhodermy. Mezhdunarodny zh-l po immunoreabilitatsii 2010; 12(2):164–165 (in Russian).
2. Bekker ZE. Fiziologiya gribov i ikh prakticheskoye ispol'zovaniye. Izd-vo Mosk gos un-ta, 1983 (in Russian).
3. Berezov TT. Biokhimicheskiye osnovy enzimoterapii opuk-holey. Aktovaya rech'. Moscow, Izd-vo UDN, 1989: 4–12 (in Russian).
4. Berezov TT. Fermentnaya terapiya opukholey. Vestnik AMN SSSR 1984; 8:11–24 (in Russian).
5. Berezov TT, Smirnova IP, Alekseyev SB, Zgurskiy AA, Diorditsa SV, Andzhaparidze OG. Ingibitor virusa gerpesa prostogo I tipa. Patent RF № 2022012, opubl 30.10.1994 (in Russian).
6. Berezov TT, Khaduyev SkH, Treshchalina YeM, Firsova GA, Sedakova AA, Umanskiy ByU, Didzhapetrev YaK, Lukashova YeV, Smirnova IP i dr. Ferment, obladayushchiy anti-proliferativnoy i antimetastaticheskoy aktivnost'yu. Avtorskoye svidetel'stvo SSSR № 1660387, opubl 1991 (in Russian).
7. Gorlenko MB. O nekotorykh napravleniyakh evolyutsii fitopatogennykh gribov. Mikol i fitopatol 1995; 25(1):87–94 (in Russian).
8. Larichev VF, Smirnova IP, Shneyder YuA. Aktivnost' L-lizin- α -oksidazy iz trikhodermy na modeli virusa klesh-chevogo entsefalita. Problemy meditsinskoj mikologii 2016; 18(2):86 (in Russian).
9. Pakina YeN, Shneyder YuA, Smirnova IP. Biologicheskaya i biokhimicheskaya stabil'nost' metabolitov saprofitnogo griba *Trichoderma harzianum* Rifai. Vestnik RUDN, seriya agronomiya 2009; 4:28–33 (in Russian).
10. Rakovskaya IV, Smirnova IP. Antimikoplazmennaya aktivnost' kul'tural'noy zhidkosti trikhodermy. Problemy meditsinskoj mikologii 2016; 18(2):108 (in Russian).
11. Smirnova IP. Produksenty oksidaz L-aminokislot i vozmozhnyye oblasti ikh primeneniya. Biotekhnologiya 1991; 3:3–7 (in Russian).
12. Smirnova IP, Alekseyev SB. Biosintez protivopukholevogo fermenta L-lizin- α -oksidazy *Trichoderma* sp. Antibiotiki i khimioterapiya 2009; 54(5–6):8–11 (in Russian).
13. Smirnova IP, Alekseyev SB, Moshkov DA. *Trichoderma* — produksent ingibitora virusa immunodefitsita cheloveka. Voprosy meditsinskoj khimii 2000; 4:384–387 (in Russian).

14. Smirnova IP, Berezov TT. Izucheniye substratnoy spetsifichnosti oksidaz L-aminokislot nekotorykh shtammov roda *Trichoderma* sp. Mikrobiologiya 1989; 58(1):49–53 (in Russian).
15. Smirnova IP, Berezov TT. Faktory regulyatsii L-lizin- α -oksidazy iz *Trichoderma* sp. Mikrobiologiya 1987; 4:708–710 (in Russian).
16. Smirnova IP, Berezov TT, Khaduyev SkH. Zavisimost' obrazovaniya antiopukholevogo fermenta L-lizin- α -oksidazy gribom *Trichoderma* sp. ot usloviy kul'tivirovaniya. Sb enzimologiya opukholey. Moscow, Izd-vo UDN, 1985: 73–77 (in Russian).
17. Smirnova IP, Karimova YeV, Shneyder YuA. Antibakterial'naya aktivnost' L-lizin- α -oksidazy iz trikhodermy. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny 2017; 163(6):743–746 (in Russian).
18. Smirnova IP, Larichev VF. Ingibitor virusa kleshchevogo entsefalita. Patent RF № 2473689, opubl 27.01.2013. Byul № 3 (in Russian).
19. Smirnova IP, Potapova OL. Induktsiya sinteza oksidaz L-aminokislot biostimulyatorami bakterial'nogo i gribnogo proiskhozhdeniya. Biotekhnologiya 1991; 2:25–26 (in Russian).
20. Smirnova IP, Potapova OL, Laugalene NF, Vesa VS, Bykova OM. Izucheniye nekotorykh kataliticheskikh svoystv indutsirovannoy L-lizin- α -oksidazy. Vopr med khimii 1992; 1:9–13 (in Russian).
21. Smirnova IP, Syatkin SP, Berezov TT. Spektrofotometricheskii metod opredeleniya L-lizin- α -oksidazy. Vopr med khimii 1984; 1:133–136 (in Russian).
22. Smirnova IP, Khaduyev SKh. L-lizin- α -oksidaznaya aktivnost' nekotorykh vidov *Trichoderma*. Mikrobiologiya 1984; 1:163–164 (in Russian).
23. Smirnova IP, Shkinev VM, Rudnev AV, Shneyder YuA, Kuzovnikov AY. Tekhnologii vydeleniya i ochistki L-lizin- α -oksidazy. Biotekhnologiya 2010; 6:52–60 (in Russian).
24. Smirnova IP, Shneyder YuA. Gemitsellyuloznyy substrat-induktor biosinteza L-lizin- α -oksidazy trikhodermoy. Vestnik RUDN, seriya agronomiya 2010; 1:20–26 (in Russian).
25. Khaduyev SKh, Glazkova TYu, Vesa VS, Laugaline NF, Puodzhuyte SP, Denis GI, Yurchenko NYa, Berezov TT. Otsenka protivoleykoznoy aktivnosti L-lizin- α -oksidazy *Trichoderma* sp. v khimioterapevticheskikh opytakh. Byull eksperiment biol i meditsiny 1989; 10:476–477 (in Russian).
26. Shneyder YuA, Smirnova IP. Opredeleniye optimal'nogo sostava sredy dlya biosinteza L-lizin- α -oksidaza griba *Trichoderma harzianum* Rifai. Problemy meditsinskoy mikologii 2011; 13(2):123 (in Russian).
27. Shneyder YuA., Khomik A.A., Kishmakhova L.M., Smirnova I.P. Kul'tivirovaniye saprofitnogo griba trikhodermy i biosintez L-lizin- α -oksidazy. Vestnik RUDN, seriya agronomiya 2010; 4:49–55 (in Russian).
28. Alexandre FR, Pantaleone DP, Taylor PP, Fotheringham IG, Ager DJ, Turner NJ. Amine-boranes: effective reducing agents for the deracemisation of dl-amino acids using l-amino acid oxidase from *Proteus myxofaciens*. Tetrahedron Letters 2002; 43(4):707–710.
29. Arima J, Sasaki C, Sakaguchi C, Mizuno H, Tamura T, Kashima A, ... & Inagaki K. Structural characterization of l-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. The FEBS journal 2009; 276(14):3894–3903.
30. Faust A, Niefind K, Hummel W, Schomburg D. The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation. Journal of molecular biology 2007; 367(1):234–248.
31. Fuller JJ, Ropke R, Krausze J, Rennhack KE, Daniel NP, Blankenfeldt W, ... & Moser J. Biosynthesis of violacein, structure and function of l-Tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. Journal of Biological Chemistry 2016; 291(38):20068–20084.
32. Gomez D, Espinosa E, Bertazzo M, Lucas-Elío P, Solano F, Sanchez-Amat A. The macromolecule with antimicrobial activity synthesized by *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strains is an L-amino acid oxidase. Applied Microbiology and Biotechnology 2008; 79:925–930.
33. Kondo H, Kitagawa M, Matsumoto Y, Saito M, Amano M, Sugiyama S, ... & Imada K. Structural basis of strict substrate recognition of L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride*. Protein Science 2020; 29(11):2213–2225.
34. Kusakabe H, Kodama K, Kuninaka A, Yoshino H, Misono H, Soda K. A new antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride*. J Bio Chem 1980; 255(3):976–981.
35. Kusakabe H, Kodama K, Kuninaka A, Yoshino H, Soda K. Effect of L-lysine- α -oxydase on youth of mouse leukemic cells. Agr Biol Chem 1980; 44:387–393.
36. Kusakabe H, Kodama K, Kuninaka A, Yoshino H, Soda K. Extracellular production of L-lysine- α -oxidase in wheat bran culture of a strain of *Trichoderma viride*. Agric Biol Chem 1979; 43(12):2531–2533.
37. Kusakabe H, Midorikawa Y, Fujishima T, Kuninaka A, Yoshino H. Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran. Agric Biol Chem 1983; 47:1323–1328.
38. Nakano S, Niwa M, Asano Y, Ito S. Following the evolutionary track of a highly specific L-arginine oxidase by reconstruction and biochemical analysis of ancestral and native enzymes. Applied and Environmental Microbiology 2019; 85(12):e00459–19. doi: 10.1128/AEM.00459-19.
39. Pokrovsky VS, Lukashev AN, Babayeva G, Karshieva SS, Arinbasarova AY, Medentzev AG, ... & Lukasheva EV. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* RIFAI VKM F-4268D in mice. Amino Acids 2021; 53:111–118.
40. Senyagin AN, Larichev VF, Smirnova IP, Podoprighora IV. A novel express method to determine activity of antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase of *Trichoderma harzianum* Rifai

- F-180. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2020; 169(1):119–121.
41. Shkinev V, Maksimova V, Makhodoeva O, Larichev V, Spivakov, Osmolovskaya B, Egorova A, Smirnova I, Dzhenloda R. Nanosized magnetite modified with poly(ethylene glycol) for efficient sorption of L-lysine- α -oxidase from the culture fluid. Elsevier, Materials Letters 2022; 323:132535. doi: 10.1016/j.matlet.2022.132535.
42. Smirnova IP, Karimova EV, Shneider YuA, Volina EG. L-lysine- α -oxidase: *Acidovorax citrulli* bacterium inhibitor. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. Immunology and Microbiology 2018; 164(4):459–461.
43. Smirnova IP, Kuznetsov VI, Podoprighora IV, Mansur TI, Senyagin AN, Bashkirova IG. Characterization of L-lysine- α -oxidase, a new antitumor and antiviral drug substance synthesized by *Trichoderma*: Life sciences-chemical. International Journal of Life science and Pharma Research 2022; 12(23):L15–20. doi: 10.22376/ijobs/lpr.2022.12.6.SP23.L15-20.
44. Smirnova IP, Kuznetsova OM, Botin AS, Siatkin SP, Kuznetsov VI, Myandina GI, Nurmuradov MK. Amino oxidase activities of antitumor enzyme producer from *Trichoderma*. Drug Invention Today 2019; 11(3):758–762.
45. Smirnova IP, Podoprighora IV, Kuznetsov VI, Mansur TI, Bashkirova IG, Das MS. Definitions of antibodies to the antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase, the study of its immunogenic properties and allergenic activity. Revista Latinoamericana de Hipertensión 2021; 16(1):56–67.
46. Smirnova IP, Podoprighora IV, Kuznetsov VI, Mansur TI, Miandina GI, Iashina NV. New *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 – L-lysine- α -oxidase antitumor enzyme producer – culture liquid-based substance biotechnology. Sys Rev Pharm 2020; 11(11):203–207.

TECHNOLOGIES OF CULTIVATION THE STRAIN-PRODUCER OF ANTITUMOR AND ANTIVIRAL SUBSTANCE L-LYSINE- α -OXIDASE FROM *TRICHODERMA*

I.P. SMIRNOVA¹, I.G. BASHKIROVA^{1,2}

¹Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow,

²All-Russian Plant Quarantine Center, Bykovo, Ramensky, Moscow region

The article is devoted to the review about technologies of cultivation the domestic strain-producer F-180 antitumor and antiviral enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma*. The study provides methodological and practical guidance in the search for highly active strains-producers of L-amino oxidases from fungal origin, in the creation of methods for determining the activity of the enzyme, the study of conditions and factors affecting its biosynthesis, in order to obtain a culture fluid of the producer with high L-lysine- α -oxidase activity. The work done served as the basis for the creation of technological regulations for enzyme biosynthesis in semi-industrial conditions.

Keywords: L-lysine- α -oxidase, *Trichoderma*, biosynthesis, regulation, reviews.

Address:

Smirnova I.P., Dr.Sci.Biol.

Professor of the Department of Biochemistry RUDN University

E-mail: smir-ip@yandex.ru

Для цитирования:

Смирнова И.П., Башкирова И.Г. Технологии культивирования штамма-производителя противоопухолевой и антивирусной субстанции L-лизин- α -оксидазы из триходермы. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3):89–99.

For citation:

Smirnova I.P., Bashkirova I.G.. Technologies of cultivation the strain-producer of antitumor and antiviral substance L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3):89–99 (in Russian).

ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

М.А. ЕФИМОВА^{1,2*}, А.Г. ГАЛЕЕВА¹, Ш.М. НАСЫРОВ¹

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»),

² ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», Казань

В обзоре подчеркивается, что на текущем этапе развития современной рабиологии известно, что наиболее эффективной стратегией, контролирующей распространение бешенства, является массовая вакцинация животных в сочетании с программами активного мониторинга эпизоотической ситуации. Однако перекрестная нейтрализация между филогруппами вируса бешенства и между вирусами внутри групп обуславливает высокую потребность в универсальных антигенах для производства как вакцинных, так и диагностических препаратов. Крупномасштабное производство целевых белков вируса бешенства для промышленных целей с сохранением высокой эффективности, чистоты, безопасности, активности, стабильности и экономичности диагностических и профилактических биопрепаратов стало возможным благодаря технологии экспрессии рекомбинантных белков. Поскольку правильная конформация и олигомеризация белка имеют решающее значение для его иммуногенности, разработка эффективного процесса экспрессии и очистки, приводящего к высокому выходу рекомбинантных G и N-белков, была основной целью различных исследований. В свою очередь, выбор системы экспрессии зависит от свойств целевого белка и способности хозяйской клетки продуцировать белок нужного качества при соблюдении минимального набора требований. В обзоре обобщен опыт экспрессии полноразмерных G- и N-белков в про- и эукариотических системах, таких как клетки насекомых, бактерий, дрожжей, растений, рассмотрены достоинства и практическая применимость каждой системы.

Ключевые слова: *Rabies lyssavirus*, рекомбинантные белки, гетерологичная экспрессия, обзоры.

Введение

Бешенство — одна из хорошо известных и трудно контролируемых инфекций из-за широкого круга восприимчивых животных, особенно в дикой природе. Согласно результатам многочисленных исследований, наиболее эффективной стратегией, контролирующей распространение бешенства, является массовая вакцинация животных в сочетании с программами активного мониторинга эпизоотической ситуации. Иммунобиологические и патогенные свойства вирусов рода *Lyssavirus* изучаются на протяжении более 100 лет с учетом отслеживания появления мутаций, ответственных за изменение антигенных и функциональных свойств вирусных белков. На основании генетических и антигенных характеристик род *Lyssavirus* разделен на четыре филогруппы [1]. Ограниченная перекрестная нейтрализация между четырьмя филогруппами и между виру-

сами внутри групп обуславливает высокую потребность в универсальных антигенах для производства как вакцинных, так и диагностических препаратов. Другими причинами, по которым необходим дальнейший поиск новых кандидатов в антигены биопрепаратов, являются высокая стоимость производства вирусного сырья в клеточной культуре, низкая эффективность и производственные риски.

Геном вируса бешенства, представленный отрицательно-смысловой РНК, кодирует пять основных белков, из которых белки G и N обладают высокой эволюционной консервативностью, являются наиболее иммунологически активными и используются в качестве иммуногенов вакцин или в качестве диагностических антигенов [15].

Нуклеопротеин вируса бешенства (N-белок), инкапсулируя геномную РНК и образуя рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП), обеспечивающий матрицу для транскрипции и репликации РНК, является предпочтительной молекулярной мишенью для разработки средств диагностики острой инфекции бешенства. Эпитопы, представленные в контексте высокоорганизованной структуры РНП, активируют пролиферацию В-клеток и продукцию антител против N-белка, индуцируют мощный ответ Т-хелперов, что приводит к длительному и сильному гуморальному иммунному

© 2023 г. Ефимова М.А., Галеева А.Г., Насыров Ш.М.

* Автор для переписки:

Ефимова Марина Анатольевна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропозоонозов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,

E-mail: marina-2004r@mail.ru

ответу. N-белок вырабатывается до определяемых уровней на ранних стадиях инфекции, до накопления специфических антител, что позволяет проводить экстренную раннюю диагностику по его индикации в тканях [16].

Гликопротеин вируса бешенства (G-белок) представляет собой мембранный гликопротеин типа I, является медиатором связывания с клеточными рецепторами и проникновения в клетки [27]. G-белок состоит из цитоплазматического домена, трансмембранного домена и эктодомена, имеет семь дисульфидных связей и три потенциальных сайта N-гликозилирования, образует гомотримеры и закрепляется на мембранной оболочке вириона [12]. При правильной укладке и гликозилировании молекула G-белка высокоиммуногенна, несет эпитопы для гуморального и клеточно-опосредованного иммунного ответа, индуцированного различными штаммами вируса бешенства [40].

Белковые субъединицы G и N предпочтительнее цельного вирусного антигена из-за их четко определенной и гомогенной природы и отсутствия других иммунологически неактивных структурных и неструктурных белков, однако производство нативных G- и N-белков является трудоемким, дорогостоящим и длительным. Крупномасштабное производство целевых белков вируса бешенства для промышленных целей с сохранением высокой эффективности, чистоты, безопасности, активности, стабильности и экономичности профилактических и диагностических биопрепаратов стало возможным благодаря технологии экспрессии рекомбинантных белков. Поскольку правильная конформация и олигомеризация белка имеют решающее значение для его иммуногенности, разработка эффективного процесса экспрессии и очистки, приводящего к высокому выходу рекомбинантных N и G-белков, была основной целью различных исследований. В свою очередь, выбор системы экспрессии зависит от свойств целевого белка и способности хозяйской клетки продуцировать белок нужного качества при соблюдении минимального набора требований.

Полноразмерные версии G- и N-белков экспрессировались в про- и эукариотических системах, таких как клетки насекомых, бактерий, дрожжей, растений, хотя и с разными уровнями экспрессии [41].

Бактериальные системы экспрессии

Escherichia coli является одним из предпочтительных и широко используемых микроорганизмов для производства рекомбинантных белков. Поскольку *E. coli* не допускает гликозилирования экспрессируемых белков, то в основном используется для получения рекомбинантных белков N, P и M белков вируса бешенства. Wangbin et al. [36] подчеркивают, что рекомбинантная экспрессия

N-белка в *E. coli* имеет значительное преимущество в отношении выхода и чистоты по сравнению с традиционным методом выделения из культивируемого вируса. В экспериментах Tursunov K. et al. с соавт. [34] C-концевой фрагмент рекомбинантного N-белка накапливался в трансформированных бактериальных клетках в объеме до ~25% от общего клеточного белка. Очищенный фрагмент rN-белка эффективно распознавал антитела в сыворотке мышей, иммунизированных инактивированным вирусом бешенства. Впоследствии оптимизация кодонов гена N вируса бешенства штамма CTN-1 и клонирование его в прокариотический экспрессионный вектор pET-43.1 для индукции экспрессии в шт. BL21 (DE3) *E. coli* позволила значительно повысить выход белка высокой чистоты, пригодный для дальнейшей клинической диагностики и конструирования новых вакцин [38].

Было предпринято множество попыток экспрессировать rG-белок с использованием рекомбинантной системы *E. coli*, однако гликозилированная природа G-белка требует скорее эукариотической системы для экспрессии, чем прокариотической, в которой отсутствует механизм гликозилирования. Тем не менее продукцию рекомбинантного фрагмента (остатки 179-281) белка G в штамме *E. coli* Rosetta удалось увеличить в результате клонирования в рамке считывания с кодирующей последовательностью гексагистидиновой метки на ее N-конце и сверхэкспрессией под транскрипционной регуляцией промотора T7 [7]. Слияние небольшого убиквитиноподобного модификатора с гликопротеином бешенства также повышало экспрессию в ~1,5 раза и растворимость в ~3,0 раза по сравнению с неслитыми белками в клетках *E. coli* [29].

Сегодня *E. coli* часто используют в качестве «промежуточной» системы клонирования при конструировании гибридных молекул ДНК для других типов клеток.

Дрожжевые системы экспрессии

Тем не менее бактериальные клетки, являясь наиболее доступной и экономичной системой экспрессии, имеют ограничения в использовании, связанные с проблемами образования неправильно свернутых белков и отсутствием посттрансляционных модификаций, характерных для белков эукариот. Метилотрофные и неметилотрофные дрожжи обладают преимуществами в отношении фолдинга и посттрансляционных модификаций белка, и тем самым являются простой эукариотической системой для получения полнофункционального белка [6]. Неметилотрофные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются первыми эукариотическими микроорганизмами, геном которых был полностью секвенирован для получения большого разнообразия гетерологичных белков, применяемых в различных

отраслях пищевой промышленности и производстве биофармацевтических препаратов [2].

На базе *S. cerevisiae* были успешно экспрессированы аутентичные последовательности N-белка вируса бешенства шт. CVS (генотип 1), европейского лиссавируса летучих мышей типа 1 (EBLV-1, генотип 5) и европейского лиссавируса летучих мышей типа 2 (EBLV-2, генотип 6). Экспрессируемые *S. cerevisiae* rN-белки CVS, EBLV 1 и EBLV-2 продемонстрировали идентичную реактивность с мАт против различных лиссавирусов и общность антигенных свойств с белком, экспрессируемым «уличным» вирусом, что позволяет использовать их в качестве компонентов серологических тестов на лиссавирусы [17]. rG-белок также фактически экспрессировался *S. cerevisiae*, однако было обнаружено, что он был связан с дрожжевой мембраной и защищал морских свинок от летального заражения, но не предохранял от гибели мышей [28]. Дальнейшие исследования показали, что данный rG не подвергался нормальному процессингу, что приводило к аномальному фолдингу и образованию мультимера. Вероятно, характерный паттерн гликозилирования дрожжей с высоким содержанием маннозы не подходит для стабилизации и продукции rG-белка с полными иммуногенными свойствами [14].

Такие ограничения, как гипергликозилирование белков, низкий выход белка и нестабильность плазмид, привели к разработке альтернативных систем экспрессии. Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*, обладающие такими преимуществами, как безопасность, простота культивирования и высокая производительность, способность продуцировать рекомбинантные белки в форме, отражающей их нативную конформацию и иммуногенность, широко используются в качестве системы экспрессии гликопротеина вируса бешенства [8]. Показано, что тримерный эктодомен rG, продуцируемый *Hansenula polymorpha*, обладает хорошими антигенными свойствами и подходит для использования в качестве антигена в диагностических инструментах [24]. В ходе изучения различных подходов к усилению экспрессии G-белка Ven Azoum S. с соавт. было выявлено, что лимитирующие этапы в меньшей степени зависели от оптимизации последовательности гена, сигнальной последовательности или увеличения числа копий гена. Коэкспрессия белков окислительного фолдинга, таких как PDI1 или ERO1, и генов, связанных с глутатионом (GPX1 или GLR1), улучшали секрецию rG в 9,5, 3,3, 8,2 и 1,2 раза соответственно; секретлируемый rG-белок также был способен реагировать с нейтрализующей антирабической сывороткой, демонстрируя, таким образом, правильную укладку

рекомбинантного белка [8]. На следующем этапе эта же группа ученых изучила влияние глюкозы или метанола в качестве источников углерода на физиологию рекомбинантных клонов *P. pastoris*, экспрессирующих rG, посредством анализа транскрипции генов, участвующих в путях углеродного метаболизма. При использовании глюкозы было увеличение биомассы и уровня продукции rG по сравнению с рекомбинантным клоном, выращенным на метаноле. Кроме того, использование метанола в качестве единственного источника углерода привело к увеличению окислительного стресса. Следовательно, глюкоза, по-видимому, является оптимальным источником углерода для экспрессии rG в *P. pastoris* и может быть использована для организации процесса продукции с высокой плотностью клеток в биореакторе [9].

Для увеличения выработки G-белка в *P. pastoris* была применена стратегия мультимеризации *in vivo* путем клонирования в вектор pPIC9K, который обеспечивает многократную вставку экспрессионной интегрированной кассеты гликопротеина в геном *Pichia* путем гомологичной рекомбинации в области сайта АОХ. Мультикопийные экспрессионные штаммы *P. pastoris* оказались стабильными в производственных условиях и показали возможность сверхэкспрессии гликопротеина вируса бешенства шт. CVS посредством мультимеризации [22]. Результаты подобных исследований дают ценное представление о стадиях и гибкости биопроцесса производства rG в *P. pastoris* для получения правильно свернутого белка для разработки субъединичной вакцины против бешенства [4].

Бакуловирусные системы экспрессии

Перспективные системы на основе клеток насекомых также интенсивно изучались в качестве клеточных хозяев для продукции rG и rN [21]: так, экспрессия rG в клетках *Spodoptera frugiperda* (Sf9) с использованием рекомбинантного бакуловируса с геном G-белка под контролем полиэдринового промотора продуцировала гликопротеин правильной структуры и иммуногенными характеристиками [5]. Ramya R. et al. [25] показали высокий потенциал экспрессионной системы бакуловирус-клетка насекомого: очищенный rG, продуцируемый в клетках Sf9, обладал высокой иммуногенностью и обеспечивал 100%-ную защиту мышей при внутримозговом заражении вирулентным вирусом. В дальнейшем была разработана эффективная стратегия полного процесса получения в клетках насекомых большого количества эктодомена гликопротеина G вируса бешенства в качестве детектирующего антигена для обнаружения антирабических антител. Уровень экспрессии удалось значительно повысить и стабилизировать, используя бакуловирусную

векторную систему экспрессии в клетках насекомых Sf9 в сочетании с новым химерным промотором ($\rho\text{olh} - \rho\text{SeL}$) вместо стандартного $= \rho\text{olh}$ [32]. С целью производства гетерологичных белков в промышленных масштабах было изучено влияние первичного метаболизма клеток Sf9, коинфицированных двумя рекомбинантными бакуловирусами носителями генов гликопротеина G и M, в зависимости от разной множественности инфицирования на продукцию вирусоподобных частиц этого вируса. Динамика потребности в питательных веществах на протяжении всей фазы вирусной инфекции была связана с литическим циклом бакуловируса, а максимальную экспрессию белка наблюдали при оптимальном соотношении множественности инфицирования: для бакуловирус-G — 2,5–4,5 и для бакуловирус-M — 1,0–3,0 [18]. Экспрессионная система Sf9 оказалась эффективной и для продукции нуклеопротеина ВБ штамма CVS-11: рекомбинантный нуклеопротеин активно экспрессировался внутриклеточно и обладал высокой антигенностью [13].

Yin X. et al. использовали в качестве биореактора для производства рекомбинантных белков нуклеопротеина вируса бешенства личинки тутового шелкопряда [37]. Инфицирование личинок *Bombyx mori* рекомбинантным бакуловирусом rBmNPV(RV-N), несущим ген N вируса бешенства штамма ERA, приводило к более активной экспрессии rN, чем в клеточных линиях насекомых, и позволило получить до 50 мг очищенного белка из 1 л сырых экстрактов куколок. Иммунизация очищенным rN-антигеном защищала 90% мышей от летальной инфекции.

Клетки *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) также интенсивно изучались в качестве клеток-хозяев для продукции rG. Проанализировано множество аспектов, связанных с экспрессией rG в клетках S2, культивируемых в различных средах и концентрациях субстрата, в разных контролируемых условиях рН, температуры, оксигенации, а также их влияние на продукцию rG. rG, продуцируемый в клетках S2, был правильно олигомеризован, иммуногенен и защищал мышей от заражения вирусом бешенства [21].

Растительные системы экспрессии

Хотя системы экспрессии клеточных линий дрожжей и насекомых подвергаются посттрансляционному процессингу и модификациям, значительно отличающийся иммунологический ответ по сравнению с их паттерном посттрансляционной модификации ограничивает их использование. Как альтернатива, генетически модифицированные растения становятся многообещающей системой для экспрессии и доставки широкого спектра функционально активных биофармацевтических продуктов с меньшими затратами, особенно для программ

массовой иммунизации. По оценкам зарубежных экспертов, трансгенные растения могут быть более дешевым и безопасным источником получения рекомбинантных белков по сравнению с традиционными системами экспрессии. Привлекательность растений в качестве систем экспрессии для накопления фармацевтически ценных белков обеспечивается многими обстоятельствами. Прежде всего, в растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка патогенами животного происхождения — вирусами и прионами. Растительные клетки обеспечивают правильную посттрансляционную модификацию рекомбинантного белка, характерную для эукариотических клеток, а также его сборку и фолдинг.

Опосредованная агробактериями трансформация и экспрессия антигена бешенства впервые были зарегистрированы в томате. Правильно свернутый и гликолизированный гликопротеин экспрессировался под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты в листьях и плодах трансгенного томата [29]. Экспрессия вирусных белков в растениях оказалась полезной не только для наработки значительного количества вирусных антигенов для целей диагностики, но и для создания пероральных вакцин: трансгенные растения с целевым геном, попадая в макроорганизм через пищеварительный тракт, способны индуцировать иммунный ответ [35].

Ashraf S. et al. [3] удалось оптимизировать кодоны синтетического гена, кодирующего G-белок, для *Nicotiana tabacum*. Трансгенные линии табака экспрессировали химерный rG-белок в количестве 0,38% от общего растворимого белка листа. Мыши, иммунизированные внутрибрюшинно rG, очищенным из микросомальной фракции листьев табака в дозе 25 мкг, приобретали более напряженный иммунный ответ по сравнению с инактивированной коммерческой вирусной вакциной и были устойчивы при интрацеребральном заражении штаммом CVS вируса бешенства. Сложный конструкт, содержащий антигенные детерминанты G- и N-белков вируса бешенства, клонировали в виде трансляционного продукта, слитого с белком оболочки вируса альфа-мозаики, для экспрессии химерного пептида в клетках табака и шпината. Парентеральная иммунизация мышей очищенным рекомбинантным белком, выделенным из табака, защищала их от заражения вирусом бешенства; листья трансгенного шпината, содержащие антигенные эпитопы вируса бешенства, также обладали иммуногенной активностью в испытаниях на добровольцах [39]. Loza Rubio E. et al. [20] получены трансгенные растения кукурузы, продуцирующие G белок вируса бешенства в доле около 1% от общего содержания растворимых растительных белков в зернах. Скармливание

мышам однократно зёрен кукурузы, содержащих 50 мкг вирусного белка, формировало у них защиту от летального заражения. В последующем в экспериментах на овцах ими же было показано, что при однократном приеме 2 мг вирусного белка достигается защитный эффект, сопоставимый с результатом, полученным при иммунизации животных цельновирионной инъекционной вакциной [19].

К настоящему времени удалось достичь высокоуровневой продукции G-белка вируса бешенства в клетках *Nicotiana benthamiana* с использованием временной трансфекции. rG, продуцируемый в растениях, характеризовался N-гликозилированием, хорошей растворимостью и высокой иммуногенностью [23].

Экспрессия в клетках млекопитающих

Использование клеток млекопитающих в крупномасштабных процессах получения антигена вируса бешенства для вакцинации является основой многих антирабических вакцин второго поколения. В этом контексте следует отметить, что имеется лишь несколько сообщений о стабильной экспрессии rG в клетках млекопитающих. Одна из причин заключается в том, что паттерн гликозилирования rG также может быть критическим в этих системах. Как и для многих других рекомбинантных белков, он зависит от используемого типа клеток и может меняться в зависимости от условий культивирования клеток [10, 11]. Например, при трансфекции клеток нейроblastомы (NA) и почки сирийского хомячка (ВНК-21) вектором, полученным из ретровирусов, правильно гликозилировался только rG, экспрессируемый в клетках ВНК-21. Кроме того, rG, конститутивно экспрессирующийся в клетках ВНК-21, и rG, продуцируемый после инфицирования вирусом бешенства, демонстрирует разные паттерны гликозилирования [5].

Другая группа ученых продемонстрировала, что в клетках ВНК-21 образование основных эпитопов rG зависело преимущественно от условий культивирования [27]. Сходные результаты были получены при сравнении экспрессии rG на клеточных линиях фибробластов африканской зеленой мартышки (COS-1), NA и ВНК-21, где были также обнаружены разные паттерны гликозилирования, обусловленные влиянием факторов клетки-хозяина [26, 33]. Высокая и стабильная внеклеточная экспрессия рекомбинантного эктодомена G-белка с выходом до 50 мг на литр культуральной жидкости и чистотой более 95% была достигнута в клетках CHO и HEK-293F путем замены исходного сигнального пептида вирусного гликопротеина на пептид из тяжелой цепи иммуноглобулина G человека. rG имел нативную укладку и иммунологически релевантные антигенные сайты, включая нейтрализующий антигенный эпитоп. Антитела, индуцированные очищен-

ным G-белком, проявляли более широкую реактивность с инактивированными антигенами фиксированных штаммов вируса бешенства, что дало возможность успешно использовать очищенный рекомбинантный G-белок для разработки недорогого иммуоферментного серотеста и субъединичной вакцины против бешенства [41].

Заключение

Таким образом, на современном этапе развития рабиологии продолжается активный поиск новых антирабических препаратов, в том числе с привлечением разнообразных методов генной инженерии и молекулярной вирусологии. Разработка и внедрение в ветеринарную практику профилактических препаратов нового поколения, сконструированных с использованием рекомбинантных технологий, на сегодняшний день являются лишь перспективой в силу наличия недостатков, к которым можно отнести небольшие объемы выхода целевого продукта, недостаточно высокий уровень специфической активности, сложные технологии получения и контроля, влияющие на конечную стоимость препарата. Тем не менее имеющийся научный задел открывает перспективы и задает вектор будущих изысканий в области конструирования эффективных и безопасных вакцин и диагностикумов. Расширение спектра антирабических иммунобиологических препаратов, внедренных в ветеринарную практику, будет способствовать окончательной элиминации бешенства в дикой фауне.

Литература

1. Метлин А.Е. Современные аспекты классификации лиссавирусов // Ветеринария сегодня. — 2017. — № 3. — С. 52–57.
2. Эльдаров М.А., Кишиковская С.А., Танацук Т.Н., Марданов А.В. Геномика и биохимия винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Успехи биологической химии. — 2016. — Т. 56. — С. 155–196.
3. Ashraf S. et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice // Journal of Biotechnology. — 2005. — Vol. 119. — No. 1. — P. 1–14.
4. Askri H., Akrouti I., Rourou S., Kallèl H. Production, purification, and characterization of recombinant rabies virus glycoprotein expressed in PichiaPink™ yeast // Biotechnology Reports (Amsterdam). — 2022. — Vol. 35. — e00736. doi: 10.1016/j.btre.2022.e00736.
5. Astray R.M., Jorge S.A., Pereira C.A. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein //

- Archives of Virology. — 2017. — Vol. 162. — No. 2. — P. 323–332.
6. *Baghban R. et al.* Yeast expression systems: Overview and recent advances // *Molecular Biotechnology*. — 2019. — Vol. 61. — No. 5. — P. 365–384.
 7. *Bassi E.J. et al.* Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179–281) of the G protein from rabies virus ERA strain // *Protein Expression and Purification*. — 2008. — Vol. 59. — No. 2. — P. 309–313.
 8. *Ben Azoun S. et al.* Molecular optimization of rabies virus glycoprotein expression in *Pichia pastoris* // *Microbial Biotechnology*. — 2016. — Vol. 9. — No. 3. — P. 355–368.
 9. *Ben Azoun S., Kallel H.* Investigating the effect of carbon source on rabies virus glycoprotein production in *Pichia pastoris* by a transcriptomic approach // *Microbiology Open*. — 2017. — Vol. 6. — No. 4. — e00489. doi:10.1111/1751-7915.12350.
 10. *Brooks S.A.* Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system // *Molecular Biotechnology*. — 2004. — Vol. 28. — No. 3. — P. 241–255.
 11. *Butler M.* Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals // *Applied Microbiology and Biotechnology*. — 2005. — Vol. 68. — No. 3. — P. 283–291.
 12. *Callaway H.M. et al.* Structure of the rabies virus glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody // *Science Advances*. — 2022. — Vol. 8. — No. 24. — eabp9151. doi: 10.1126/sciadv.abp9151.
 13. *Cao L. et al.* Expression and characterization of rabies virus nucleoprotein in baculovirus // *Bing Du Xue Bao*. — 2010. — Vol. 26. — No. 5. — P. 351–356.
 14. *De Pourcq K., De Schutter K., Callewaert N.* Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives // *Applied Microbiology and Biotechnology*. — 2010. — Vol. 87. — No. 5. — P. 1617–1631.
 15. *Gérard F.C.A. et al.* Structure and dynamics of the unassembled nucleoprotein of rabies virus in complex with its phosphoprotein chaperone Module // *Viruses*. — 2022. — Vol. 14. — No. 12. — Art. 2813. doi.org/10.3390/v14122813.
 16. *Koser M.L. et al.* Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens // *PNAS*. — 2004. — Vol. 101. — No. 25. — P. 9405–9410.
 17. *Kucinskaite I. et al.* Antigenic characterisation of yeast-expressed lyssavirus nucleoproteins // *Virus Genes*. — 2007. — Vol. 35. — No. 3. — P. 521–529.
 18. *Leme J. et al.* Sf9 Cells metabolism and viability when coinfecting with two monocistronic baculoviruses to produce rabies virus-like particles // *Molecular Biotechnology*. — 2023. — Vol. 65. — No. 6. — P. 970–982.
 19. *Loza Rubio E. et al.* Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein // *Vaccine*. — 2012. — Vol. 30. — No. 37. — P. 5551–5556.
 20. *Loza Rubio E. et al.* Development of an edible rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain // *Developmental Biology*. — 2008. — Vol. 131. — P. 477–482.
 21. *Moraes A.M. et al.* *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development // *Biotechnology Advances*. — 2012. — Vol. 30. — No. 3. — P. 613–628.
 22. *Ningaraju T.M., Ramanjini Gowda P.H.* Cloning and over expression of CVS rabies virus glycoprotein gene in *Pichia pastoris* by multimerization // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. — 2018. — Vol. 7. — No. 12. — P. 1233–1255.
 23. *Park Y. et al.* Rabies virus glycoprotein produced in *Nicotiana benthamiana* is an immunogenic antigen in mice // *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. — 2021. — Vol. 57. — No. 1. — P. 26–35.
 24. *Qian W., Aguilar F., Wang T., Qiu B.* Secretion of truncated recombinant rabies virus glycoprotein with preserved antigenic properties using a co-expression system in *Hansenula polymorpha* // *Journal of Microbiology*. — 2013. — Vol. 51. — No. 2. — P. 234–240.
 25. *Ramya R. et al.* Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice // *Clinical and Vaccine Immunology*. — 2011. — Vol. 18. — No. 10. — P. 1673–1679.
 26. *Rath A. et al.* DNA vaccine for rabies: relevance of the trans-membrane domain of the glycoprotein in generating an antibody response // *Virus Research*. — 2005. — Vol. 113. — No. 2. — P. 143–152.
 27. *Sakai M. et al.* Studies on the conditions required for structural and functional maturation of rabies virus glycoprotein (G) in G cDNA-transfected cells // *Microbiology and Immunology*. — 2004. — Vol. 48. — No. 11. — P. 853–864.
 28. *Sakamoto S. et al.* Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells // *Vaccine*. — 1999. — Vol. 17. — No. 3. — P. 205–218.
 29. *Singh A., Kaur G., Singh S. et al.* Recombinant plant engineering for immunotherapeutic production // *Current Molecular Biology Reports*. — 2017. — Vol. 3. — No. 4. — P. 306–316.
 30. *Singh A. et al.* Enhanced expression of rabies virus surface G-protein in *Escherichia coli* using SUMO fusion // *The Protein Journal*. — 2012. — Vol. 31. — No. 1. — P. 68–74.
 31. *Takeyama N., Kiyono H., Yuki Y.* Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials // *Therapeutic Advances in Vaccines*. — 2015. — Vol. 3. — No. 5–6. — P. 139–154.
 32. *Targovnik A.M. et al.* Highly efficient production of rabies virus glycoprotein G ectodomain in Sf9 insect cells // *Journal of Biotechnology*. — 2019. — Vol. 9. — No. 11. — Art. 385. doi: 10.1007/s13205-019-1920-4.

33. Tejwani V., Andersen M.R., Nam J.H., Sharfstein S.T. Glycoengineering in CHO cells: Advances in systems biology // *Biotechnology Journal*. – 2018. – Vol. 13. – No. 3. – e1700234. doi: 10.1002/biot.201700234.
34. Tursunov K. et al. Cloning and expression of fragment of the rabies virus nucleoprotein gene in *Escherichia coli* and evaluation of antigenicity of the expression product // *Iranian Journal of Veterinary Research*. – 2017. – Vol. 18. – No. 1. – P. 36–42.
35. Vzina L.P. et al. Plants as an innovative and accelerated vaccine-manufacturing solution: a plant-based expression system could provide greater speed and capacity than other recombinant technologies at a comparatively low cost // *BioPharm International*. – 2011. – P. S27–S30.
36. Wangbin C. et al. Expression of nucleoprotein gene of CTN strain rabies virus from China in *E. coli* with antigenicity // *Veterinary Medicine*. – 2013. – Vol. 3. – P. 309–313.
37. Yin X. et al. Rabies virus nucleoprotein expressed in silkworm pupae at high-levels and evaluation of immune responses in mice // *Journal of Biotechnology*. – 2013. – Vol. 163. – No. 3. – P. 333–338.
38. Yuanxue R.E.N. et al. Codon optimization improves the expression of nucleoprotein of rabies virus CTN-1 strain in *E. coli* // *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*. – 2021. – No. 12. – P. 333–337.
39. Yusibov V. et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine // *Vaccine*. – 2002. – Vol. 20. – No. 25–26. – P. 3155–3164.
40. Zhang G., Wang H., Mahmood F., Fu Z.F. Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – Vol. 162. – No. 2–4. – P. 601–613.
41. Zhao R. et al. Novel strategy for expression and characterization of rabies virus glycoprotein // *Protein Expression and Purification*. – 2020. – Vol. 168. – Art. 105567. doi: 10.1016/j.pep.2019.105567.
5. Astray RM, Jorge SA, Pereira CA. Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein. *Archives of Virology* 2017; 162(2):323–332.
6. Baghban R et al. Yeast expression systems: Overview and recent advances. *Molecular Biotechnology* 2019; 61(5):365–384.
7. Bassi EJ et al. Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179–281) of the G protein from rabies virus ERA strain. *Protein Expression and Purification* 2008; 59(2):309–313.
8. Ben Azoun S et al. Molecular optimization of rabies virus glycoprotein expression in *Pichia pastoris*. *Microbial Biotechnology* 2016; 9(3):355–368.
9. Ben Azoun S, Kallel H. Investigating the effect of carbon source on rabies virus glycoprotein production in *Pichia pastoris* by a transcriptomic approach. *Microbiology Open* 2017; 6(4):e00489. doi:10.1111/1751-7915.12350.
10. Brooks SA. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Molecular Biotechnology* 2004; 28(3):241–255.
11. Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005; 68(3):283–291.
12. Callaway HM et al. Structure of the rabies virus glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science Advances* 2022; 8(24): eabp9151. doi: 10.1126/sciadv.abp9151.
13. Cao L et al. Expression and characterization of rabies virus nucleoprotein in baculovirus. *Bing Du Xue Bao* 2010; 26(5):351–356.
14. De Pourcq K, De Schutter K, Callewaert N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 87(5):1617–1631.
15. Gérard FCA et al. Structure and dynamics of the unassembled nucleoprotein of rabies virus in complex with its phosphoprotein chaperone Module. *Viruses* 2022; 1(12):2813. doi.org/10.3390/v14122813.
16. Koser ML et al. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. *PNAS* 2004; 10(25):9405–9410.
17. Kucinskaite I et al. Antigenic characterisation of yeast-expressed lyssavirus nucleoproteins. *Virus Genes* 2007; 35(3):521–529.
18. Leme J et al. Sf9 Cells metabolism and viability when coinfecting with two monocistronic baculoviruses to produce rabies virus-like particles. *Molecular Biotechnology* 2023; 65(6):970–982.
19. Loza Rubio E et al. Induction of a protective immune response to rabies virus in sheep after oral immunization with transgenic maize, expressing the rabies virus glycoprotein. *Vaccine* 2012; 30(37):5551–5556.
20. Loza Rubio E et al. Development of an edible rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain. *Developmental Biology* 2008; 131:477–482.

References

1. Metlin AYе. Sovremennyye aspekty klassifikatsii lissavirusov. *Veterinariya segodnya* 2017; 3:52–57 (in Russian).
2. El'darov MA, Kishkovskaya SA, Tanashchuk TN, Mardanov AV. Genomika i biokhimiya vinnykh shtammov drozhzhay *Saccharomyces cerevisiae*. *Uspekhi biologicheskoy khimii* 2016; 56:155–196 (in Russian).
3. Ashraf S et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *Journal of Biotechnology* 2005; 119(1):1–14.
4. Askri H, Akrouti I, Rourou S, Kallèl H. Production, purification, and characterization of recombinant rabies virus glycoprotein expressed in *PichiaPink™* yeast. *Biotechnology Reports (Amsterdam)* 2022; 35:e00736. doi: 10.1016/j.btre.2022.e00736.

21. Moraes AM et al. *Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. *Biotechnology Advances* 2012; 30(3):613–628.
22. Ningaraju TM, Ramanjini Gowda PH. Cloning and over expression of CVS rabies virus glycoprotein gene in *Pichia pastoris* by multimerization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2018; 7(12):1233–1255.
23. Park Y et al. Rabies virus glycoprotein produced in *Nicotiana benthamiana* is an immunogenic antigen in mice. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 2021; 57(1):26–35.
24. Qian W, Aguilar F, Wang T, Qiu B. Secretion of truncated recombinant rabies virus glycoprotein with preserved antigenic properties using a co-expression system in *Hansenula polymorpha*. *Journal of Microbiology* 2013; 51(2):234–240.
25. Ramya R et al. Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice. *Clinical and Vaccine Immunology* 2011; 18(10):1673–1679.
26. Rath A et al. DNA vaccine for rabies: relevance of the trans-membrane domain of the glycoprotein in generating an antibody response. *Virus Research* 2005; 113(2):143–152.
27. Sakai M et al. Studies on the conditions required for structural and functional maturation of rabies virus glycoprotein (G) in G cDNA-transfected cells. *Microbiology and Immunology* 2004; 48(11):853–864.
28. Sakamoto S et al. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. *Vaccine* 1999; 17(3):205–218.
29. Singh A, Kaur G, Singh S et al. Recombinant plant engineering for immunotherapeutic production. *Current Molecular Biology Reports* 2017; 3(4):306–316.
30. Singh A et al. Enhanced expression of rabies virus surface G-protein in *Escherichia coli* using SUMO fusion. *The Protein Journal* 2012; 31(1):68–74.
31. Takeyama N, Kiyono H, Yuki Y. Plant-based vaccines for animals and humans: recent advances in technology and clinical trials. *Therapeutic Advances in Vaccines* 2015; 3(5–6):139–154.
32. Targovnik AM et al. Highly efficient production of rabies virus glycoprotein G ectodomain in Sf9 insect cells. *Journal of Biotechnology* 2019; 9(11):385. doi: 10.1007/s13205-019-1920-4.
33. Tejwani V, Andersen MR, Nam JH, Sharfstein ST. Glycoengineering in CHO cells: Advances in systems biology. *Biotechnology Journal* 2018; 13(3):e1700234. doi: 10.1002/biot.201700234.
34. Tursunov K et al. Cloning and expression of fragment of the rabies virus nucleoprotein gene in *Escherichia coli* and evaluation of antigenicity of the expression product. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2017; 18(1):36–42.
35. Vzina LP et al. Plants as an innovative and accelerated vaccine-manufacturing solution: a plant-based expression system could provide greater speed and capacity than other recombinant technologies at a comparatively low cost. *BioPharm International* 2011:S27–S30.
36. Wangbin C et al. Expression of nucleoprotein gene of CTN strain rabies virus from China in *E. coli* with antigenicity. *Veterinary Medicine* 2013; 3:309–313.
37. Yin X et al. Rabies virus nucleoprotein expressed in silkworm pupae at high-levels and evaluation of immune responses in mice. *Journal of Biotechnology* 2013; 163(3):333–338.
38. Yuanxue REN et al. Codon optimization improves the expression of nucleoprotein of rabies virus CTN-1 strain in *E. coli*. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* 2021; 12:333–337.
39. Yusibov V et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002; 20(25)–26:3155–3164.
40. Zhang G, Wang H, Mahmood F, Fu ZF. Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms. *Veterinary Microbiology* 2013; 162(2–4):601–613.
41. Zhao R et al. Novel strategy for expression and characterization of rabies virus glycoprotein. *Protein Expression and Purification* 2020; 168:105567. doi: 10.1016/j.pep.2019.105567.

HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEMS FOR RECOMBINANT RABIES VIRUS PROTEINS

М.А. ЕФИМОВА^{1,2}, А.Г. ГАЛЕЕВА¹, С.М. НАСЫРОВ¹

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety,

² Kazan State Academy of veterinary medicine, Kazan

At the current stage of development of modern rabiology, it is known that the most effective strategy controlling the spread of rabies is mass vaccination of animals in combination with active monitoring programs of the epizootic situation. However, cross-neutralization between rabies virus phylogroups and between viruses within groups causes a high need for universal antigens for the production of both vaccine and diagnostic drugs. Large-scale production of target rabies virus proteins for industrial purposes while maintaining high efficiency, purity, safety, activity, stability and cost-effectiveness of diagnostic and preventive biological products has

become possible thanks to the technology of expression of recombinant proteins. Since the correct conformation and oligomerization of a protein are crucial for its immunogenicity, the development of an effective expression and purification process leading to a high yield of recombinant G and N proteins has been the main goal of various studies. In turn, the choice of the expression system depends on the properties of the target protein and the ability of the host cell to produce a protein of the desired quality while meeting a minimum set of requirements. This review summarizes the experience of expression of full-size G- and N-proteins in pro- and eukaryotic systems, such as insect cells, bacteria, yeast, plants, and considers the advantages and practical applicability of each system.

Keywords: Rabies lyssavirus, recombinant proteins, heterologous expression, reviews.

Address:

Efimova M.A.

doctor of biological sciences, Leading Researcher at the laboratory of viral anthroozoonoses of the Federal State Budgetary Institution «FCTRB-VNIVI»

E-mail: marina-2004r@mail.ru

Для цитирования:

Ефимова М.А., Галеева А.Г., Насыров Ш.М. Гетерологичные системы экспрессии рекомбинантных белков вируса бешенства. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(3): 100–108.

For citation:

Efimova M.A., Galeeva A.G., Nasyrov S.M. Heterologous expression systems for recombinant rabies virus proteins. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(3): 100–108 (in Russian).

К 100-летию получения Нобелевской премии за открытие инсулина*



Фредерик Бантинг (1891–1941)

В 2023 году исполнилось 100 лет со дня присуждения Нобелевской премии по медицине за открытие инсулина. Ее вручили (19-ю по счету) Фредерику Бантингу и Джону Маклеоду. Из знаковых событий XX столетия интеллектуальный рывок с инсулином сопоставим разве что с внедрением антибиотиков спустя 20 лет. Поражает и то, что неожиданное открытие инсулина в 1921 году нашло быстрое его внедрение в практику, и случилось беспрецедентно быстрое присуждение престижной премии через два года.

История разобралась со всеми лицами, причастными к этому выдающемуся событию, но все-таки лидером, душой этого дела был хирург Бантинг. Поэтому лучше всего привести его слова (в извлечениях), сказанные в Нобелевской речи «Диабет и инсулин» — произнесена в 1925 г. (https://translated.turbopages.org/proxy_u/en-ru.ru.e2c424d7-6510855e-472ae62c-74722d776562/https/www.nobelprize.org/prizes/medicine/1923/banting/lecture).

Как всегда, в любом исследовании важна неожиданная ассоциация предшествующих фактов. Так и в случае с инсулином — понадобилась догадка Бантинга о смысле опытной нейтрализации действия трипсина в полифункциональном комплексе поджелудочной железы. Дело в том, что еще до него было обнаружено, что при экспериментальном закрытии (перевязке) выводного

протока панкреас наблюдалась дегенерация ее экзокринных клеток, вырабатывающих трипсин. При этом не повреждались островки Лангерганса. Отталкиваясь от этого факта, Бантинг наметил план извлечения и последующего изучения инсулина из сохранявшихся островков. Свои действия и дальнейшие события он обстоятельно изложил в указанной речи.

«30 октября 1920 года меня привлекла статья Мозеса Барона, в которой он указал на сходство между дегенеративными изменениями в ацинусных клетках поджелудочной железы после экспериментальной перевязки протока и изменениями после закупорки протока желчными камнями»... «14 апреля 1921 года я начал работать над этой идеей в физиологической лаборатории Университета Торонто. Профессор Маклеод выделил мне доктора Чарльза Беста в качестве помощника. Нашим первым шагом было перевязать протоки поджелудочной железы у ряда собак»...

Дальше последовала серия продуманных экспериментов. «...В феврале 1922 года, профессор Маклеод оставил свою работу по кислородному голоданию и направил весь свой лабораторный персонал на изучение физиологических свойств того, что сейчас известно как инсулин.

Доктор Коллип взялся за биохимическую очистку активного вещества и провел масштаб дробного осаждения 70–95% спиртом и преуспел в получении более совершенного конечного продукта. Но, к сожалению, его метод не был применим к крупномасштабному производству. Затем доктор Бест занялся крупномасштабным производством и внес большой вклад в разработку принципов производства и очистки. Эта работа была проведена в лабораториях Коннота под руководством профессора Фитцджеральда...».

Дальше наступил форсированный период тщательной клинической апробации препарата (первая попытка была сделана в январе 1922 г., но без явного успеха). Однако целенаправленный труд дал свои плоды, и известие об успехах в лечении диабетиков стало известно всему миру. Нобелевский комитет оценил ситуацию и немедленно вручил заслуженную награду лидерам этого дела. В итоге всей этой деятельности ученый пришел к следующим выводам, изложенные им в заключение речи.

«В основе своей сахарный диабет можно рассматривать как нарушение обмена веществ, в первую очередь углеводов и во вторую очередь белков и жиров. Неоспоримо доказано, что для нормального метаболизма углеводов в организме необходимо достаточное количество инсулина. Из этого следует, что лечение

* Материал подготовлен Воробьевым В.С.

заключается в введении достаточного количества инсулина для восполнения дефицита в поджелудочной железе пациента.

Инсулин позволяет тяжелому диабету сжигать углеводы, о чем свидетельствует повышение дыхательного коэффициента после введения глюкозы и инсулина. Он позволяет глюкозе накапливаться в виде гликогена в печени для дальнейшего использования. Сжигание углеводов способствует полному окислению жиров, и ацидоз исчезает. Нормальный уровень сахара в крови уменьшает удручающую жажду, и, следовательно, уменьшается потребление и выделение жидкости. Поскольку усиленное питание должным образом питает клетки тканей, больше нет постоянной потребности в

еде, следовательно, голодные боли у тяжелобольных диабетиков заменяются нормальным аппетитом. При повышенном потреблении калорий пациенты быстро набирают силу и вес. С облегчением симптомов его болезни и с увеличением силы в результате усиленного питания пессимистичный, меланхоличный диабетик становится оптимистичным и жизнерадостным.

Инсулин — это не лекарство от диабета; это лечение. Он позволяет диабетика сжигать достаточное количество углеводов, так что белки и жиры могут добавляться в рацион в достаточных количествах, чтобы обеспечить энергией экономические тяготы жизни».

Наверное, это будет хорошим напутствием и нынешним практическим врачам, да и теоретикам.

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

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

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



Подписано к печати 30.09.2023
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 7,0. Тираж 1000 экз.

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