

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.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

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса. *С.Ю. Щеголев*..... 5

К вопросу об использовании отечественных фильтрационных материалов в производстве антирабического иммуноглобулина.

Е.Г. Абрамова, А.Г. Селезнева, И.М. Жулидов, Р.А. Свинцов, С.В. Генералов, Л.В. Савицкая, О.А. Лобовикова, А.К. Никифоров..... 15

Молекулярные маркеры нозокомиальных инфекций.

В.Б. Бородулин, И.В. Бабушкина, Е.В. Бородулина, Е.В. Бобылева, О.Э. Лосев, Е.Г. Чеботарева..... 21

Получение, свойства, использование и скорость деградации пленок и гелей бактериальной целлюлозы, продуцируемой *Glucanacetobacter sucrofermentans*.

Н.А. Кленова, Т.А. Овчинникова, Ю.А. Маркова, В.С. Соболева, Э.Ю. Сосова, А.Е. Ерофеева 27

Рекультивирование после длительного хранения коллекции цианобактерий *Spirulina (Arthrospira)*

с применением регенерированной питательной среды. *Д.И. Петрухина* 32

Исследование чувствительности природных штаммов люминесцентных бактерий *Vibrio* sp. к модельным токсикантам с целью использования в качестве цельноклеточных бактериальных биосенсоров. *М.В. Журавлева, Ш.К. Карчава, И.С. Сазыкин, Е.М. Кудеевская, М.И. Хаммами, Н.В. Гненная, М.А. Сазыкина*..... 37

Штаммы-продуценты термостабильного прямого гемолизина (TDH) и TDH-родственного гемолизина (TRH) *Vibrio parahaemolyticus*. *О.С. Чемисова, О.А. Рыковская, М.В. Полеева, Е.М. Санамянц* 43

Сезонные изменения протеолитической активности кальпаинов и содержания титина и небулина в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*).

Я.А. Юцкевич, С.С. Попова, Н.Н. Салмов, А.Д. Уланова, Н.М. Захарова, И.М. Вихлянцев 49

Получение генетической конструкции для экспрессии гена биназы с мутацией в потенциальном сайте димеризации белка. *И.М. Лисевич, Ф.Г. Курпьянова-Ашина, В.В. Ульянова* 60

Введение в культуру *in vitro* и регенерация побегов из эксплантов эпикотилей амаранта *Amaranthus cruentus*. *Р.М. Таипова, Б.Р. Кулуев*..... 64

Транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии единичных нейронов статоцистов виноградной улитки. *А.А. Осипов, Н.А. Асеев, Е.А. Чеснокова, М.В. Роцин, П.М. Колосов, Н.В. Баль, П.М. Балабан*..... 67

Как вычислять уравнения Ходжкина — Хаксли быстрее. *И.Е. Мысин* 72

..... 72

Обзоры

Механизмы приобретения микроорганизмами резистентности к антибиотикам.

Н.В. Гненная, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина 77

Методы исследования бактериальных биопленок. *А.В. Гильдебрант, И.С. Сазыкин, М.А. Сазыкина* 86

Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на альтернативных питательных средах: обзор.

Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба..... 92

Краткие сообщения

Изучение влияния ультразвукового воздействия на споро- и неспорообразующие бактерии.

С.С. Бойко, Е.С. Яценко 102

Страницы истории. Юбилейные и знаменательные даты 2018 года 106

Хроника. События первой половины 2018 года 109

Правила для авторов 110

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

On prokaryote systematics: actual problems and ways out of the crisis. *S.Yu. Shchyogolev* 5

Concerning the usage of domestic filtration materials in manufacturing of anti-rabies immunoglobulin.

E.G. Abramova, A.G. Selezneva, I.M. Zhulidov, R.A. Svintsov, S.V. Generalov, L.V. Savitskaya, O.A. Lobovikova, I.V. Shul'gina, A.K. Nikiforov..... 15

Molecular markers of nosocomial infections.

V.B. Borodulin, I.V. Babushkina, E.V. Borodulina, E.V. Bobyleva, O.E. Losev, E.G. Chebotareva..... 21

The preparation, properties, use and rate of degradation of the films and gels of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter sucrofermentans*.

N.A. Klenova, T.A. Ovchinnikova, U.A. Markova, V.S. Soboleva, E.U. Sosova, A.E. Erofeeva 27

Recultivation after long-term storage of cyanobacteria *Spirulina (Arthrospira)* collection with reusing a regenerated medium. *D.I. Petrukhina* 32

Investigation of the sensitivity of natural strains of luminescent bacteria *Vibrio* sp. to model toxicants for the purpose of use as cellular bacterial biosensors.

M.V. Zhuravleva, Sh.K. Karchava, I.S. Sazykin, E.M. Kudrevskaya, M.I. Hammami, N.V. Gnennaya, M.A. Sazykina 37

Vibrio parahaemolyticus strains-producers of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH). *O.S. Chemisova, O.A. Rykowskaya, M.V. Poleeva, E.M. Sanamyants* 43

Seasonal changes of proteolytic activity of calpains and the content of titin and nebulin in striated muscles of the long-tailed ground squirrels (*Spermophilus undulatus*).

Y.A. Yutskevich, S.S. Popova, N.N. Salmov, A.D. Ulanova, N.M. Zakharova, I.M. Vikhlyantsev..... 49

Plasmid construction for expression of binase gene mutated in proposed protein dimerization site.

I.M. Lisevich, F.G. Kupriyanova-Ashina, V.V. Ulyanova 60

Introduction to *in vitro* culture and regeneration of shoots from epicotyl explants of *Amaranthus cruentus*.

R.M. Taipova, B.R. Kuluev 64

Transcriptome analysis of differential expression of single neurons of statocysts in grape snail.

A.A. Osyrov, P.M. Kolosov, N.A. Aseyev, E.A. Chesnokova, M.V. Roshchin, N.V. Bal, P.M. Balaban..... 67

How to compute Hodgkin-Huxley equations faster. *I.E. Mysin* 72

Reviews

Mechanisms of acquisition by microorganisms of resistance to antibiotics.

N.V. Gnennaya, I.S. Sazykin, M.A. Sazykina 77

Methods of bacterial biofilms study. *A.V. Gildebrant, I.S. Sazykin, M.A. Sazykina* 86

Biosynthesis of bacterial cellulose on alternative nutrient media: review.

E.K. Gladysheva, E.A. Skiba 92

Short communications

Study of the influence of ultrasound on spore and non-spore forming bacteria.

S.S. Boyko, E.S. Yatsenko..... 102

Pages of history. Anniversary and significant dates 2018 106

The chronicle. Events of the first half-year 2018 109

Rules for authors 110

К читателям

В первом номере за 2018 год помещен ряд оригинальных и обзорных статей, часть из которых представлена многочисленными коллективами активно работающих биотехнологов, биохимиков, микробиологов и других специалистов.

Среди них можно отметить, например, сотрудников Южного федерального университета (Ростов-на-Дону). Так, М.В. Журавлева с соавторами излагают результаты исследования чувствительности природных штаммов люминесцентных бактерий *Vibrio* sp. к модельным токсикантам с целью использования в качестве цельноклеточных бактериальных биосенсоров. В обзоре Гненной Н.В. с коллегами обсуждены механизмы приобретения микроорганизмами резистентности к антибиотикам, а в обзорной работе Гильдебрант А.В. с сотрудниками проанализированы возможности современных методов исследования бактериальных биопленок. Добротный материал публикуется еще в одной статье из Ростовского противочумного института (Чемисова О.С. и др.), в которой освещены итоги изучения штаммов продуцентов термостабильного прямого гемолизина (TDH) и TDH-родственного гемолизина (TRH) *Vibrio parahaemolyticus*.

Интересные работы представили также саратовские специалисты, которые регулярно публикуют в нашем журнале свои данные. Профессор С.Ю. Щеголев, директор Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, в статье «О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса» рассматривает теоретические и методологические аспекты этой темы, используя конкретный экспериментальный материал. Абрамова Е.Г. и др. из Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» исследовали вопрос об использовании отечественных фильтрационных материалов в производстве антирабического иммуноглобулина. Бородулин В.Б. с соавторами (Саратовский государственный медицинский университет) изучили молекулярные маркеры нозокомиальных инфекций.

Кленова Н.А. и др. (Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева) исследовали деградацию пленок и гелей бактериальной целлюлозы, продуцируемой *Gluconacetobacter sucrofermentas*.

Мысин И.Г. (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН) представил свой особый подход к убыстренному вычислению уравнений Ходжкина — Хаксли.

Осипов А.А. с коллегами (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва) провели транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии единичных нейронов статоцистов виноградной улитки.

Петрухина Д.И. из Калужского государственного университета им. К.Э. Циолковского рассмотрела вопрос о рекультивировании после долговременного хранения коллекции цианобактерий *Spirulina (Arthrospira)*.

Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. (Уфа) провели исследование культуры амаранта с целью изучения регенерации побегов.

Группа сотрудников из Краснодара и Пущино (Юцкевич Я.А. и др.) изучала сезонные изменения протеолитической активности кальпаинов и содержания титина и небулина в поперечнополосатых мышцах суслика.

В статье И.М. Лисевич и др. из Казанского (Приволжского) федерального университета описано получение генетической конструкции, несущей ген биназы с мутацией R15A для последующего выделения белка и его физико-химического анализа.

Гладышева Е.К., Скиба Е.А. (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, Бийск) сделали обзор по проблеме биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на альтернативных питательных средах.

Наконец, в кратком сообщении Бойко С.С. и Яценко Е.С. (Алтайский госуниверситет, Барнаул) представлены результаты изучения влияния ультразвука на спорообразующие и неспорообразующие микроорганизмы.

В заключение приводятся юбилейные даты 2018 года и информация о XXX зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», посвященной 30-й годовщине со дня смерти академика Ю.А. Овчинникова.

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

О СИСТЕМАТИКЕ ПРОКАРИОТ: АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ВЫХОДА ИЗ КРИЗИСА

С.Ю. ЩЕГОЛЕВ*

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
Саратов*

Рассматриваются проблемы таксономических исследований прокариот, проявляющиеся в повседневной лабораторной практике и приобретающие особую остроту в связи с опубликованием в последние годы ряда принципиальных обобщающих работ в области сравнительной геномики и биоинформатики. Констатируются возможности и ограничения традиционных филогенетических маркеров — последовательностей генов 16S рРНК и интергенного спейсера ITS1 в связи с внутригеномной гетерогенностью рибосомного оперона *rnr*, обусловленной гомологичной рекомбинацией ДНК и горизонтальным переносом генов. Отмечается значение концепции пангенома для интерпретации таксономических данных, полученных с использованием разнообразных филогенетических маркеров, относящихся к его базовой и подвижной составляющим. Обсуждается возможность применения результатов полногеномного секвенирования ДНК штаммов с целью выхода за пределы парадигмы использования в качестве филогенетических маркеров отдельных генов или даже их ограниченных групп. На примере бактерий рода *Azospirillum* демонстрируются полученные автором оценки внутригеномной гетерогенности последовательностей 16S рРНК и результаты применения набора филогенетических тестов на основе полногеномных данных в рамках развиваемой в ряде публикаций геномной таксономии микробов. Установлена зависимость оценки систематического положения штаммов от типа используемых полногеномных данных, относящихся к базовой или подвижной составляющим пангенома. Отмечается, что до достижения условий, обеспечивающих получение результатов полногеномного секвенирования ДНК прокариот в масштабах, обеспечивающих достаточное наполнение соответствующих баз данных, наиболее корректным остается полифазный подход с сочетанием разнообразных молекулярно-генетических тестов с хемотаксономическими, физиологическими и культуральными свойствами исследуемых изолятов.

Ключевые слова: прокариоты, систематика, филогенетические маркеры, пангеном, полногеномное секвенирование, геномная таксономия.

Введение

Развитие методов и средств биоинформатики [15] и результаты их применения в сравнительной геномике [3] создают предпосылки для разносторонних исследований актуальных проблем в области систематики прокариот [19], проявляющихся в том числе в повседневной лабораторной практике [1, 16, 17]. Прежде всего, это касается возможностей и ограничений традиционных филогенетических маркеров — последовательностей генов 16S рРНК и интергенного спейсера ITS1, являющегося составной частью рибо-

сомного оперона *rnr*, расположенной между генами 16S и 23S рРНК [8].

Результаты филогенетических исследований, приведенные в работах [1, 7], демонстрируют примеры неоднозначности видовой идентификации бактериальных штаммов, обусловленной высокой консервативностью последовательностей 16S рРНК, приводящей к их практическому совпадению в рамках принятого до недавнего времени «золотого стандарта» для отнесения штаммов к одному и тому же виду — 97% идентичности [27]. По состоянию на ноябрь 2016 года в состав 1912 таких таксономических групп входили 6193 бактериальных вида [24], почти половина всех поименованных к настоящему времени. В статье [22] было предложено уточнить значение указанной выше границы отсечения видов по идентичности 16S рРНК, что получило подтверждение в работе [12] на большом статистическом материале (6787 геномов, 22 таксономические группы) и составляет на сегодняшний день 98,65%. В обновленной версии Интер-

© 2018 г. Щеголев С.Ю.

* Автор для переписки:

Щеголев Сергей Юрьевич

д.х.н., профессор, директор Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

E-mail: shegolev_s@ibppm.ru

нет-ресурса [10] это значение принято по умолчанию, но пользователю предоставлена возможность самому задать границу отсечения при извлечении из базы данных набора соответствующих последовательностей 16S рРНК.

Таким образом, видовые отличия внутри подобных групп определяются иными физиолого-биохимическими и молекулярно-генетическими свойствами и с большой вероятностью — горизонтальным переносом генов [3]. В связи с этим следует отметить прогноз, сделанный в работе [30], согласно которому скорость определения новых видов по 16S рРНК к концу 2017 г. может приблизиться к нулю. В указанной публикации приводятся также установленные авторами границы отсечения штаммов по идентичности последовательностей 16S рРНК для таксонов более высокого ранга. К примеру, для родов и семейств они составляют, соответственно, 94,5—98,65 и 86,5—94,5%.

С другой стороны, в литературе встречаются публикации, констатирующие выход значений идентичности последовательностей 16S рРНК, определяемых для разных аллелей этого гена, за пределы, установленные для вида (см. выше). Примером может служить работа [16], в которой подобные оценки проведены для бактерий рода *Azospirillum*. Это связывают с внутригеномной гетерогенностью рибосомного оперона *rnp* [8], обусловленной гомологичной рекомбинацией ДНК и горизонтальным переносом генов, роль которого в целом в процессах видообразования у прокариот (в том числе, в связи с проблемами их систематики) многосторонне и убедительно обсуждается в монографии Кунина Е.В. (2014) [3].

В еще большей степени внутригеномная гетерогенность оперона *rnp* сказывается на результатах таксономических исследований прокариот с использованием интергенного спейсера ITS1, обладающего более высокой по сравнению с 16S рРНК разрешающей способностью (вариабельностью) в видовой идентификации штаммов. Следует отметить, что в случае эукариот, для которых влияние горизонтального переноса генов существенно ослабевает [3], ITS1 как филогенетический маркер [8] весьма успешно используется в широком спектре исследований разнообразных организмов (растений, грибов, насекомых) [11]. Однако для прокариот имеется немало указаний на высокую зависимость последовательностей ITS1 в аллелях от горизонтального переноса генов (см., например, публикации [14, 17]) с изменчивостью, достигающей уровня изменчивости ITS1 между видами, что также приводит к неоднозначности при видовой идентификации изолятов.

В связи с упомянутыми наблюдениями целесообразно указать на принципиальные результаты, приведенные в книге [3], в которой таксономические конструкции для

прокариот рассматриваются при сочетании их древовидной (наследование признаков от предков к потомкам по вертикали) и сетевой (горизонтальный перенос генов) составляющих. При этом древовидная структура соответствует преимущественно генам информационного типа (репликация, транскрипция, трансляция), тогда как сетевая структура — преимущественно генам операционного типа (клеточный метаболизм, мембранные белки, сигнальные молекулы и т.д.). Гены первого типа входят в состав базовой, а второго — подвижной (как правило) части пангенома, концепция которого отражена, в частности, в работах [3, 19].

В книге [3] обращается внимание на то, что у каждого гена имеется, строго говоря, своя эволюционная история, и более корректным автору представляется рассмотрение не древа, а скорее — леса жизни. Тем не менее из миллиардов планетарного пула генов, доступных для обмена среди прокариот, имеется около ста генов информационного типа, эволюционная история которых достаточно четко отражает древовидную эволюционную историю организмов. Важно отметить, что консенсусная топология группы почти универсальных деревьев данной категории практически повторяет древо последовательностей гена 16S рРНК [3], остающегося (несмотря на указанные выше ограничения) основным филогенетическим маркером в многочисленных таксономических исследованиях земной биоты [30]. Причем, речь идет о достаточно надежных, по крайней мере, на уровне надвидовых таксонов и весьма актуальных в разнообразных метагеномных и глобальных эволюционных исследованиях [3, 18, 21], число анализируемых последовательностей в которых достигает порядка сотен тысяч и более.

Увеличение разрешающей способности и надежности видовой идентификации прокариот обеспечивает привлечение к рассмотрению групп генов [5, 9, 19]. В работе [9] применены наборы по 16 аминокислотных последовательностей специальным образом подобранных белков рибосомы из организмов, для которых имелись совокупности генетических данных, интерпретируемые как (почти) полные геномы, что обеспечивало дополнительную информацию о наличии или отсутствии у рассматриваемых организмов тех или иных метаболизм. На обобщенном филогенетическом древе жизни [9] отмечается большой обособленный кластер из некультивируемых объектов (идентифицируемых как потенциальное расхождение типов), обнаруживаемых также в значительной части доменов бактерий и архей. Констатируется, что подобные объекты (выявляемые, как правило, в метагеномных исследованиях) отличаются «урезанным» геномом с отсутствием важных метаболитов и с большой вероятностью

относятся к симбионтам, разделяющим часть жизненных функций с микро- и макропартнерами.

Весьма перспективным следует признать также возможный выход за пределы парадигмы использования в качестве филогенетического маркера единственного гена или даже ограниченной группы генов. Благоприятные предпосылки для этого обеспечены прогрессом в развитии технологий секвенирования ДНК [19], открывающим перспективу широкого внедрения в практику таксономических исследований полногеномных данных. На этой основе как альтернативы традиционным подходам предполагается развитие геномной таксономии микробов [26]. В качестве главных филогенетических характеристик в указанном исследовании отмечаются тесты с использованием: а) средней нуклеотидной идентичности (ANI), б) средней аминокислотной идентичности (AAI), в) компьютерной (*in silico*) гибридизации ДНК-ДНК, г) сигнатур Карлина (различий между геномами в относительном избытке динуклеотидов).

В настоящей работе нами использованы результаты полногеномного секвенирования ДНК штаммов бактерий рода *Azospirillum*, представленные на сегодняшний день в базе данных GenBank. Азоспириллы привлекают внимание широкого круга специалистов в качестве модельного объекта в изучении феномена растительно-микробной ассоциативности [20], а также как основа для создания разнообразных биопрепаратов для растениеводства, биоремедиации объектов окружающей среды и т.д. Эти бактерии служат одним из главных объектов в исследованиях, проводимых в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН), и составляют оригинальную часть его Коллекции ризосферных микроорганизмов [2], включающей в себя самое крупное собрание азоспирилл в России и Европе.

Целью нашей работы было получение более детальных по сравнению с работой [16] оценок внутригеномной гетерогенности последовательностей 16S рРНК азоспирилл, а также анализ результатов применения к ним перечисленных выше тестов в рамках развиваемой геномной таксономии микробов [26].

Материалы и методы

Штаммы бактерий рода *Azospirillum*, для которых по состоянию на период работы над данным материалом были найдены в GenBank'e результаты полногеномного секвенирования их ДНК, и общие характеристики геномов представлены в таблице 1. Коды доступа к сборке GenBank (опция Assembly)

(см. третий столбец табл. 1) могут служить отправными пунктами для перехода по соответствующим ссылкам к развернутым таксономическим, физиолого-биохимическим и т.д. характеристикам штаммов, а также к аннотациям генов и их продуктов.

Для попарных сравнений последовательностей 16S рРНК в оценках их внутригеномной гетерогенности использовали программу LALIGN [13]. Для получения матриц попарных сравнений по результатам полногеномного секвенирования ДНК штаммов и соответствующих им филогенетических конструкций в тестах, рекомендованных в работе [26], применяли методы, данные о которых приведены в таблице 2. По этим данным можно получить подробные описания методов и ссылки на соответствующую литературу. Для построения филогенетических деревьев были выбраны стандартные методы ближайшего связывания (NJ) и попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA).

Результаты и обсуждение

Нами получены оценки внутригеномной изменчивости 16S рРНК на всем доступном к настоящему времени материале с полногеномным секвенированием ДНК азоспирилл на уровне хромосом и плазмид (см. табл. 1). Результаты таких проведенных частично оценок представлены в работе [16], в которой последовательности 16S рРНК были подвергнуты предварительной обработке (триммингу), а их идентичность оценена при включении во множественное (глобальное) выравнивание последовательностей. Однако представляется более оправданным проведение прямых сравнений последовательностей их попарным локальным выравниванием с использованием программы LALIGN [13], поскольку их идентичность принято сопоставлять с результатами экспериментов по гибридизации ДНК-ДНК. В том числе это было сделано при установлении отмеченного выше «золотого стандарта» [22].

Результаты таких оценок, выполненных нами в сопоставлении с данными работы [16], представлены в таблице 3, в которой приведены минимальные значения попарной идентичности 16S рРНК между аллелями в геномах. Жирным курсивом в таблице 3 выделены значения, выходящие за пределы интервала внутривидовой идентичности последовательностей 16S рРНК с обновленным значением границы отсечения для видов 98,65%, а в последней строке дано их общее число для штаммов (в скобках — по данным работы [16]). Доля таких значений среди всех принятых нами в расчет попарных сравнений среди аллелей 16S рРНК штаммов *Azospirillum* в количестве 201 сравнение

составила 12%. Таким образом, внутригеномная гетерогенность 16S рРНК для азоспирилл с вероятностью выхода значений попарной идентичности 16S рРНК

между аллелями на межвидовой уровень примерно в каждом восьмом случае не может считаться пренебрежимо малой.

Таблица 1

Характеристика использованных бактериальных штаммов и их геномов

№	Имя	Код доступа к сборке	Уровень геномной сборки*
1	<i>A. brasilense</i> Sp 7	GCA_001315015.1	chr, pl
2	<i>A. brasilense</i> Sp245	GCA_000237365.1	chr, pl
3	<i>A. brasilense</i> Az39	GCA_000632475.2	chr, pl
4	<i>A. lipoferum</i> 4B	GCA_000283655.1	chr, pl
5	<i>A. thiophilum</i> DSM 21654	GCA_000960825.1	chr, pl
6	<i>A. thiophilum</i> BV-S	GCA_001305595.1	chr, pl
7	<i>A. humicireducens</i> SgZ-5	GCA_001639105.1	chr, pl
8	<i>A. oryzae</i> A2P	GCA_900177515.1	chr, pl
9	<i>A. sp.</i> B510	GCA_000010725.1	chr, pl
10	<i>A. brasilense</i> Sp 7	GCA_002027385.1	contigs
11	<i>A. brasilense</i> FP2	GCA_000404045.1	contigs
12	<i>A. brasilense</i> V6	GCA_002027445.1	contigs
13	<i>A. brasilense</i> 2A1	GCA_002245955.1	contigs
14	<i>A. lipoferum</i> R1C	GCA_900177475.1	contigs
15	<i>A. halopraeferens</i> DSM 3675	GCA_000429625.1	contigs
16	<i>A. (Niveispirillum) irakense</i> DSM 11586	GCA_000429645.1	contigs
17	<i>A. sp.</i> B4	GCA_000333275.1	contigs
18	<i>A. sp.</i> B506	GCA_000333595.1	contigs

Примечание: * chr, pl – хромосомы, плазмиды; contigs – черновая сборка

Таблица 2

Характеристика методов, использованных в таксономических исследованиях

Тест	Интернет-ресурс	Ссылка
ANI/AAI	enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix	Goris et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007; 57:81–91
Гибридизация ДНК-ДНК <i>in silico</i> *	ggdc.dsmz.de/ggdc.php#	Mukherjee et al. Nat. Biotechnol. 2017; 35:676–683
Сигнатуры Карлина	www.cmbl.uga.edu/software/delta-differences.html	Campbell et al. PNAS USA. 1999; 96:9184–9189

Примечание: * Метод GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator) – калькулятор для определения эволюционных расстояний между геномами

Таблица 3

Попарная идентичность последовательностей 16S рРНК (%) среди аллелей штаммов рода *Azospirillum**

Штамм	br_az39	br_sp7	lipo_4b	thiop_bvs	spb510	br_sp245	humic_sgz5
Мин. по LALIGN	98,7	98,5	98,0	99,3	99,3	99,2	98,9
Мин. по работе [16]	99,3	99,1	98,3	99,3	99,2	–	–
< 98,65%	–	18	6 (5)	–	–	–	–

Примечание: * br_az39 – *A. brasilense* Az39; br_sp7 – *A. brasilense* Sp7; lipo_4b – *A. lipoferum* 4B; thiop_bvs – *A. thiophilum* BV-S; spb510 – *A. sp.* B510; br_sp245 – *A. brasilense* Sp245; humic_sgz5 – *A. humicireducens* SgZ-5

Аналогичные оценки работы [16] стали поводом для авторов к поискам филогенетического маркера, более устойчивого к внутригеномным трансформациям. В качестве такового ими предложена последовательность гена *groD* фактора инициации транскрипции, показавшего также корреляцию в оценках эволюционного сходства между штаммами с полногеномными данными. По мнению авторов [16], до тех пор пока полногеномное секвенирование не получит широкого распространения в качестве стандартного метода идентификации бактерий, генотипирование с использованием единичных генов такого типа будет оставаться достаточно надежным и относительно мало затратным средством для быстрой предварительной идентификации изолятов.

Нам представлялось, однако, целесообразным проведение таксономических исследований азоспирилл с применением современных средств сравнительной геномики, отраженных в таблице 2. На рисунке 1 приведены результаты применения теста средней нуклеотидной идентичности ANI, показавшие, что из шести штаммов, отнесенных их авторами к виду *A. brasilense*, три, согласно рассматриваемому тесту (*Sp245*, *Az39*, *2A1*), должны быть выведены за пределы данного вида. Эти результаты подтверждаются также результатами

парных сравнений в пределах вида *A. brasilense* последовательностей 16S рРНК (в настоящей статье не приводятся). Довольно далеко за пределы одного и того же вида выходят также значения ANI для штаммов *A. lipoferum* 4В и *A. lipoferum* R1С. Заметим, что только совместное рассмотрение филогенетических деревьев с матрицами парных сравнений позволяет выявить принадлежность тех или иных монофилетических групп к одному или разным видам.

Однако при переходе к тесту со средней аминокислотной идентичностью AAI (рис. 2) — сравнениям протеомов — все шесть штаммов оказываются снова в пределах вида *A. brasilense*. При том, что один из штаммов *A. lipoferum* следует признать не соответствующим виду *A. lipoferum* в обоих (и всех последующих использованных нами) тестах. Это наблюдение для *A. brasilense* можно связать с существенной разницей в алгоритмах определения средней нуклеотидной и аминокислотной идентичности. Тест ANI оперирует с базовой составляющей пангенома, тогда как в тесте AAI мы имеем дело с результатами белковой трансляции последовательностей ДНК на геномах в целом, без отделения вкладов ортологов и паралогов от ксенологов (подвижной части пангенома).

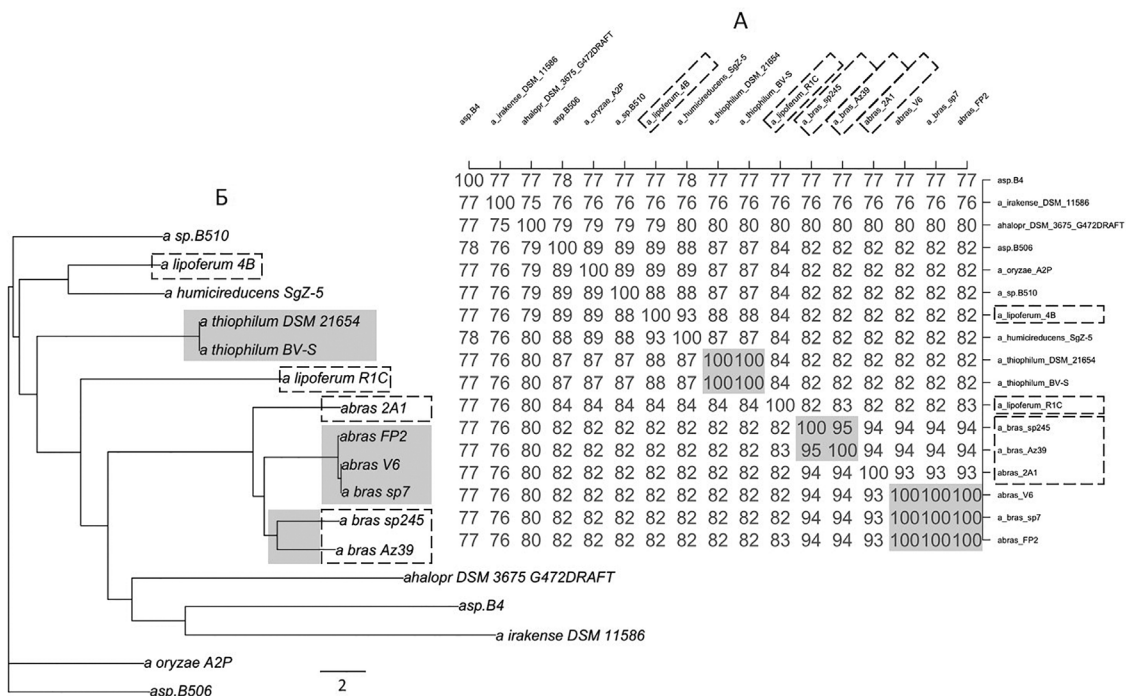


Рис. 1. Матрица парных сравнений (А) и филограмма видов *Azospirillum* по методу NJ (Б) в тесте ANI — усредненные значения идентичности/сходства между гомологичными областями геномов. Серым выделены результаты для штаммов, удовлетворяющие условию внутривидовой идентичности ($ANI \geq 95\%$), пунктиром — соответствующие межвидовому уровню $ANI < 95\%$ для *A. brasilense* и *A. lipoferum*

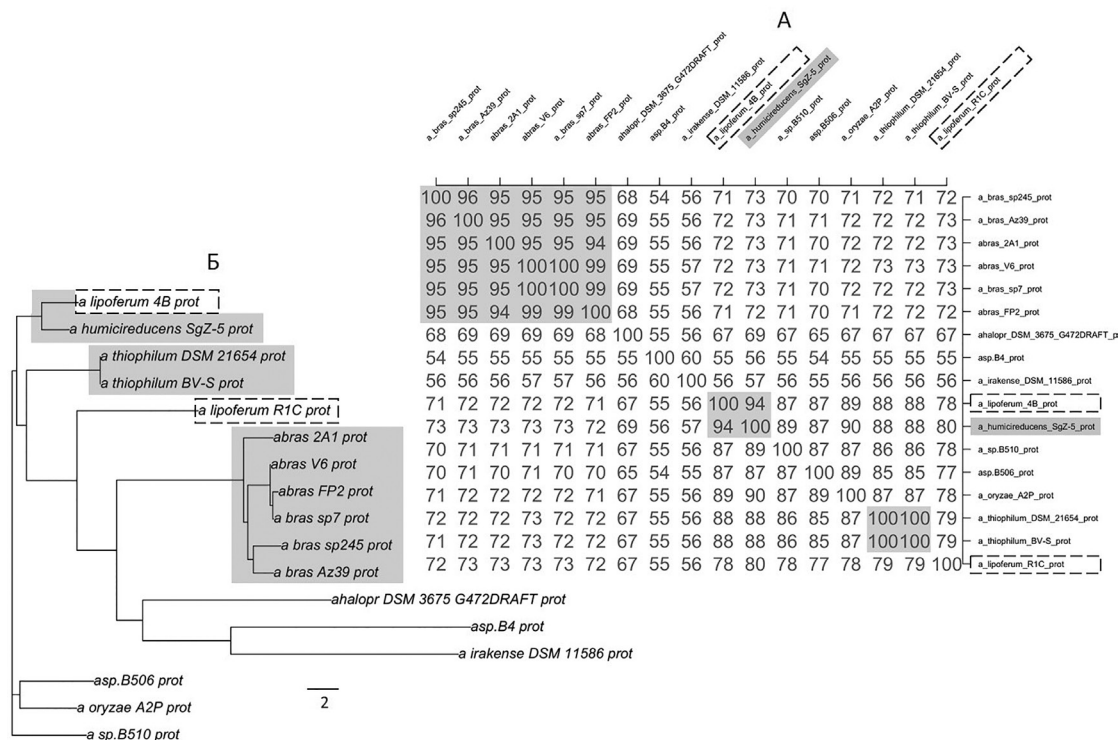


Рис. 2. Матрица попарных сравнений (А) и филограмма видов *Azospirillum* по методу NJ (Б) в тесте ААИ – усредненные значения идентичности/сходства между гомологичными областями протеомов. Серым выделены результаты для штаммов, удовлетворяющие условию внутривидовой идентичности ($AAI \geq 90\%$), пунктиром – соответствующие межвидовому уровню $AAI < 90\%$ для *A. lipoferum*

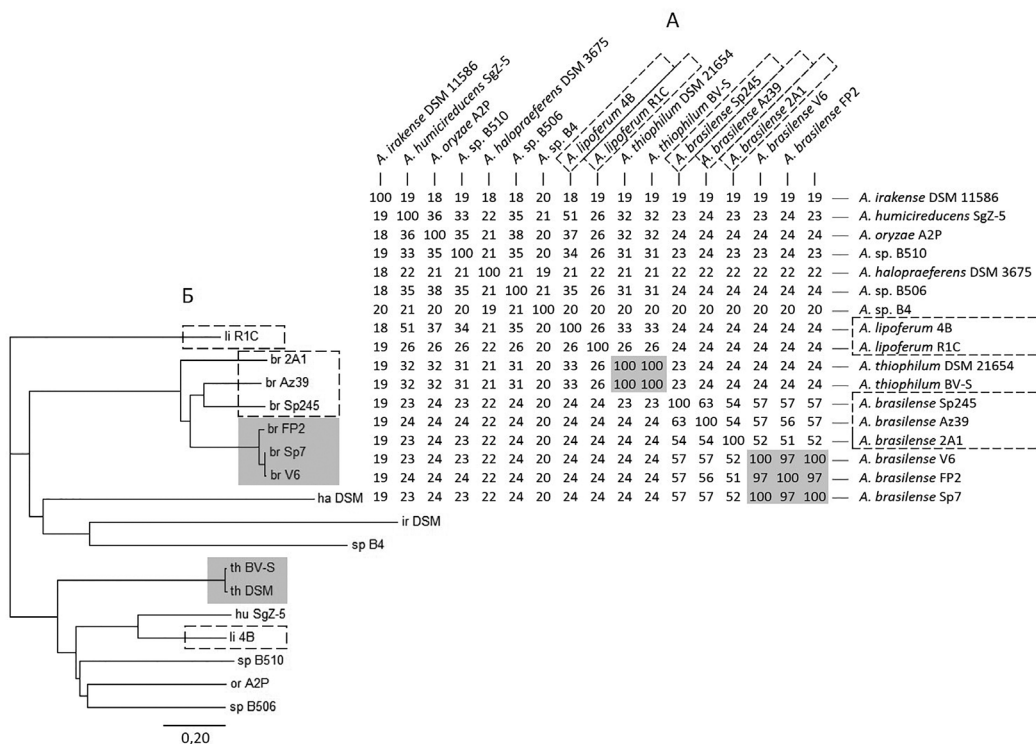


Рис. 3. Матрица попарных сравнений (А) и филограмма видов *Azospirillum* по методу NJ (Б) в тесте GGDC, формула 2 – усредненные значения идентичности, деленные на длину пар сегментов с высоким счетом. Серым выделены результаты для штаммов, удовлетворяющие внутривидовому уровню гибридизации ДНК-ДНК > 70%, пунктиром – соответствующие межвидовому уровню гибридизации < 70% для *A. brasilense* и *A. lipoferum*

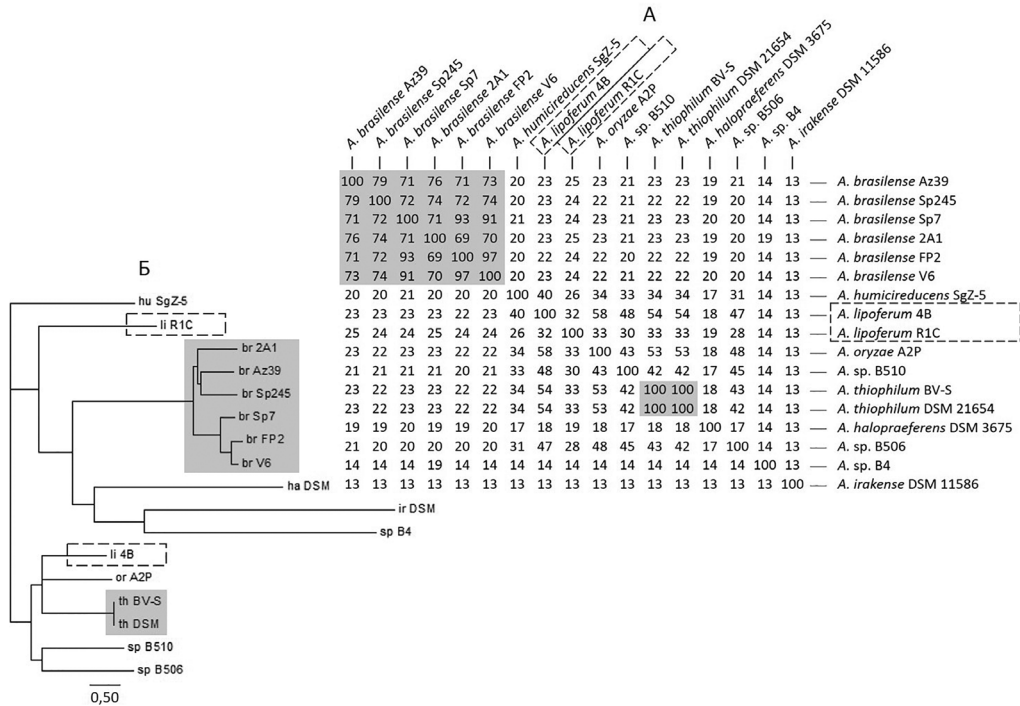


Рис. 4. Матрица попарных сравнений (А) и филограмма видов *Azospirillum* по методу NJ (Б) в тесте GGDC, формула 1 — усредненные значения длин пар сегментов с высоким счетом, деленным на общую длину сегментов. Серым выделены результаты для штаммов, удовлетворяющие внутривидовому уровню гибридизации ДНК-ДНК >70%, пунктиром — соответствующие межвидовому уровню гибридизации <70% для *A. lipoferum*

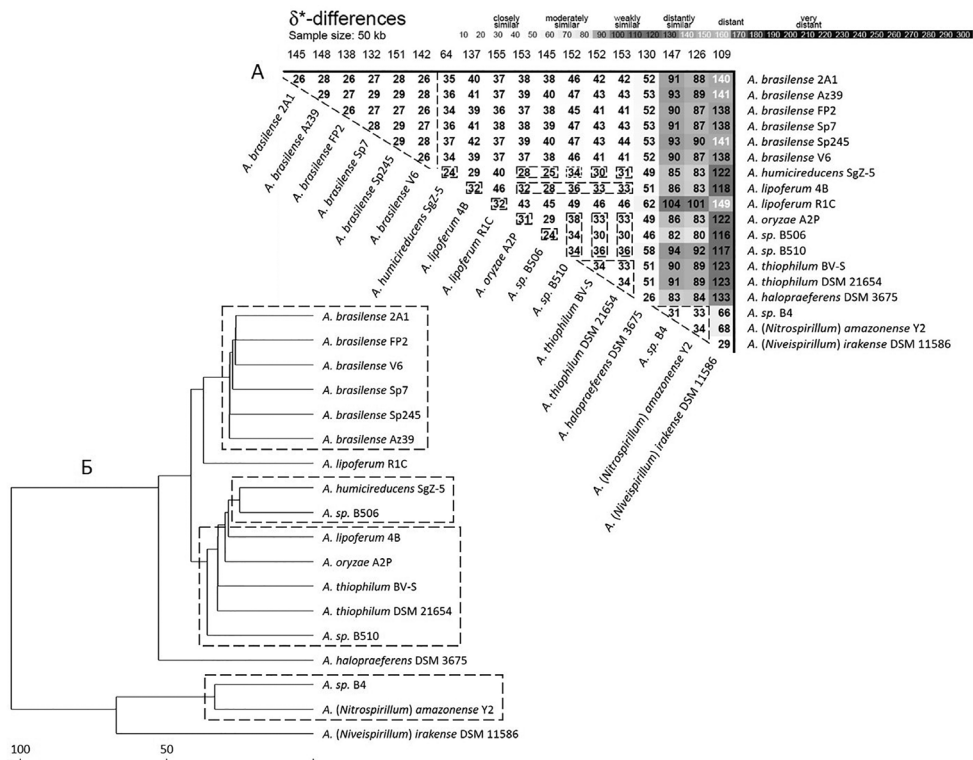


Рис. 5. Матрица попарных сравнений (А) и филограмма видов *Azospirillum* по методу UPGMA (Б) в тесте с использованием сигнатур Карлина. Оттенкам серого соответствует разный уровень сходства между геномами, оцениваемого по значениям δ^* -difference. Пунктиром выделены результаты для штаммов, соответствующие уменьшенному вдвое внутривидовому уровню различий между значениями δ^* -difference (<5), рекомендованному в работе (Thompson et al., 2013) (<10)

К тому же существенно возрастает вероятность проявления эффектов горизонтального переноса генов, сближающих, по-видимому, структуру протеомов разных штаммов вида *A. brasilense*, к которому они были отнесены изначально авторами штаммов по целому ряду дополнительных признаков.

Эту интерпретацию подтверждают результаты работы [28], часто упоминаемой в публикациях по рассматриваемой нами теме. В ней на достаточно большом статистическом материале — около полумиллиона белков из почти шестидесяти тысяч семейств — сделан вывод о подавляющем вкладе горизонтального переноса генов в диверсификацию белковых семейств (89–99% случаев). Для азоспирилл в работе [29] показано, что примерно половина их геномов может состоять из привнесенных горизонтально генов, кодирующих признаки, определяющие их ассоциативные взаимодействия с растениями. Надо еще заметить, что исторически на уровне базовой составляющей пангенома (в данном случае 16S рРНК), объединяющей так называемые «гены домашнего хозяйства», азоспириллы были и остаются представителями водной микрофлоры [29]. Об этом свидетельствует, в частности, и таксономическое окружение монофилетической группы видов *Azospirillum*, представленной в релизе LTPs128_Ssu проекта Древа жизни всех видов [25].

На рисунках 3 и 4 суммированы результаты компьютерной гибридизации ДНК-ДНК (тесты GGDC, см. табл. 2) геномов азоспирилл. Первый вариант GGDC (см. рис. 3) аналогичен тесту ANI и также оперирует фактически с базовой составляющей пангенома. Однако, как отмечается в материалах, приведенных на веб-сайте, отраженном в таблице 2, преимуществом теста GGDC перед ANI являются его лучшая согласованность с технологией реальных экспериментов по гибридизации ДНК-ДНК и полученные с ними корреляции. В отличие от GGDC по формуле 2 (см. рис. 3), вариант GGDC по формуле 1 (см. рис. 4) использует данные, соответствующие геномам в целом.

Сравнение данных, представленных на рисунках 1–4 (а также 16S рРНК, отмеченных при обсуждении, см. рис. 1), выявляет согласие результатов оценки систематического положения штаммов в тестах 16S рРНК ↔ ANI ↔ GGDC (формула 2) и AAI ↔ GGDC (формула 1). Правда, этого нельзя сказать о тесте на основе сигнатур Карлина (рис. 5). В нем используется динуклеотидный состав геномов, он не требует выравниваний, может быть реализован на ограниченных фрагментах генома и обладает другими формальными преимуществами. Тем не менее разрешающая способ-

ность этого теста на межвидовом уровне оказалась в нашем случае недостаточной даже при уменьшенном вдвое критерии разделения видов, предложенном в исследовании [26]. Вариант его развития в сторону увеличения разрешающей способности связывают с привлечением для расчета эволюционных отличий между штаммами так называемого расстояния Махаланобиса, что нашло отражение в работе [23].

Заключение

Насколько известно автору, сравнение результатов применения набора тестов, предлагаемых в работе [26] в рамках геномной таксономии микробов, для азоспирилл нами выполнено впервые. Несмотря на весьма ограниченный набор полногеномных данных для прокариот по сравнению, например, с последовательностями 16S рРНК, исчисляемыми сотнями тысяч, полученные результаты довольно показательны и демонстрируют некоторые существенные, на наш взгляд, моменты. В том числе это касается зависимости оценок систематического положения штаммов от типа используемых полногеномных данных, относящихся к базовой или подвижной составляющим пангенома. Взаимное соответствие таких оценок будет определяться, в частности, степенью открытости пангеномов [3, 19], а также соотношением вкладов в их эволюцию горизонтального переноса генов и гомологичной рекомбинации ДНК на фоне происходящих в геномах регулярных мутаций [6]. Так что единой системы причисления изолятов к тому или иному виду (как и самой видовой классификации прокариот) пока, по-видимому, не существует. В качестве некоего компромисса в работе [4] предлагается дополнять сложившиеся видовые наименования штаммов прокариот указанием их экотипов.

Преимущество применения в таксономических исследованиях полногеномных данных по сравнению с использованием в качестве филогенетических маркеров отдельных генов (ограниченных наборов генов) признается очевидным [3]. Однако их эффективность зависит от степени наполнения и качества баз данных последовательностей референтных геномов, остающихся пока недостаточными для повсеместного распространения на практике подходов на основе расширенного варианта риботипирования [8] и геномной таксономии микробов [26]. Прогресс в этой области связан с существенным усовершенствованием систем секвенирования и сборки геномов с целью обеспечения соответствующей массовости и доступности результатов полногеномного (метагеномного) секвенирования ДНК прокариот.

Так что до достижения перечисленных условий и результатов наиболее корректным в систематике прокариот следует признать полифазный подход [19] с сочетанием разнообразных молекулярно-генетических тестов с хемотаксономическими, физиологическими и культуральными свойствами исследуемых изолятов [1].

Литература

1. Бурьгин Г.Л., Попова И.А., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.), идентифицированный как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2 // Сельхоз. биол. — 2017. — Т. 52. — № 1. — С. 105–115.
2. Коллекция ризосферных микроорганизмов [Электронный ресурс] http://ibprp.ru/kolleksiya_mikrobnuyh_kultur.html.
3. Кунин Е.В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции. — М.: ЗАО Изд-во Центрполиграф, 2014. — 527 с.
4. Cohan F.M. What are bacterial species? // Annu. Rev. Microbiol. — 2002. — Vol. 56. — P. 457–487.
5. De Vos P. Multilocus sequence determination and analysis // In: Taxonomy of Prokaryotes — Methods in Microbiology. Vol. 38 / F.A. Rainey, A. Oren (Eds.). — Amsterdam: Elsevier, 2011. — P. 385–407.
6. Doolittle W.F. What is a bacterial species? // Microbiol. Today. — 2006. — Vol. 33. — No. 6. — P. 148–151.
7. Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1992. — Vol. 42. — No. 1. — P. 166–170.
8. Gürtler V., Subrahmanyam G., Shakar M., Maiti B., Karunasagar I. Bacterial typing and identification by genomic analysis of 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer (ITS) sequences // Meth. Microbiol. — 2014. — Vol. 41. — P. 253–274.
9. Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K., Brown C.T., Probst A.J., Castelle C.J., Butterfield C.N., HERNSDORF A.W., AMANO Y., ISE K., SUZUKI Y., DUDEK N., RELMAN D.A., FINSTAD K.M., AMUNDSON R., THOMAS B.C., BANFIELD J.F. A new view of the tree of life // Nat. Microbiol. — 2016. — Vol. 1. — No. 16048. — P. 1–6.
10. Identify Service [Электронный ресурс] <https://www.ezbiocloud.net/identify>.
11. Internal transcribed spacer [Электронный ресурс] https://en.wikipedia.org/wiki/Internal_transcribed_spacer.
12. Kim M., Oh H.-S., Park S.-C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2014. — Vol. 64. — P. 346–351.
13. LALIGN [Электронный ресурс] https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html.
14. Leuhn M., Bathe S., Achouak W., Hartmann A., Heulin T., Schloter M. Comparative sequence analysis of the internal transcribed spacer 1 of *Ochrobactrum* species // Syst. Appl. Microbiol. — 2006. — Vol. 29. — P. 265–275.
15. Lesk A.M. Introduction to bioinformatics. Fourth edition. — Oxford: Oxford University Press, 2014. — 400 p.
16. Maroniche G.A., Garcia J.E., Salcedo F., Creus C.M. Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers // Microbiol. Res. — 2017. — Vol. 195. — P. 1–10.
17. Maslunka C., Gurtler V., Seviour R.J. The impact of horizontal gene transfer on targeting the internal transcribed spacer region (ITS) to identify *Acinetobacter junii* strains // J. Appl. Microbiol. — 2015. — Vol. 118. — P. 1435–1443.
18. Million Sequence Clustering [Электронный ресурс] <http://salsahpc.indiana.edu/millionseq/index.html>.
19. Oren A., Garrity G.M. Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years // Antonie van Leeuwenhoek. — 2014. — Vol. 106. — P. 43–56.
20. Pereg L., de-Bashan L.E., Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants // Plant Soil. — 2016. — Vol. 399. — P. 389–414.
21. Pershina E.V., Dolnik A.S., Tamazyan G.S., Vyatkina K.V., Porozov Y.B., Pinaev A.G., Karimov S.O., Provorov N.A., Andronov E.E. The evolutionary space model to be used for the metagenomic analysis of molecular and adaptive evolution in the bacterial communities // In: Evolutionary biology: genome evolution, speciation, coevolution and origin of life / P. Pontarotti (Ed.). — Springer, 2014. — P. 339–355.
22. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // Microbiology Today. — 2006. — Vol. 33. — No. 6. — P. 152–155.
23. Suzuki H., Sota M., Brown C.J., Top E.M. Using Mahalanobis distance to compare genomic signatures between bacterial plasmids and chromosomes // Nucl. Acids Res. — 2008. — Vol. 36. — No. 22. — e147.
24. Taxonomic Group [Электронный ресурс] http://old.ezbiocloud.net/eztaxon/taxonomic_group.
25. The All-Species Living Tree Project [Электронный ресурс] <https://www.arb-silva.de/projects/living-tree>.
26. Thompson C.C., Chimetto L., Edwards R.A., Swings J., Stackebrandt E., Thompson F.L. Microbial genomic taxonomy // BMC Genomics. — 2013. — Vol. 14. — No. 913. — P. 1–8.
27. Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse H.-J., Ludwig W., Kampfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2010. — Vol. 60. — P. 249–266.
28. Treangen T.J., Rocha E.P.C. Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes // PLoS Genetics. — 2011. — Vol. 7. — No. 1. — e1001284.

29. Wisniewski-Dye F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W.H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Condemine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A.H., Gonzalez V., Mavingui P., Zhulin I.B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments // *PLoS Genetics*. – 2011. – Vol. 7. – No. 12. – e1002430.
30. Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.O., Ludwig W., Schleifer K.-H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2014. – Vol. 12. – P. 635–645.

Список сокращений:

рРНК — рибосомная РНК;
 ААI — средняя аминокислотная идентичность;
 ANI — средняя нуклеотидная идентичность;
 GGDC — калькулятор для определения эволюционных расстояний между геномами;
 ITS1 — интергенный спейсер;
 NJ — в филогенетическом анализе метод ближайшего связывания;
rrn — рибосомный оперон;
 UPGMA — в филогенетическом анализе метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего.

ON PROKARYOTE SYSTEMATICS: ACTUAL PROBLEMS AND WAYS OUT OF THE CRISIS

S.Yu. SHCHYOGOLEV

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
 N.G. Chernyshevsky Saratov National Research University, Saratov*

Considered here are problems in the taxonomic study of prokaryotes. These problems show up in everyday laboratory practice and are becoming especially acute in view of the recent publication of several fundamental summarizing papers in comparative genomics and in bioinformatics. Possibilities and limitations are stated concerning traditional phylogenetic markers such as 16S rRNA gene sequences and the ITS1 intergenic spacer, in the context of the intragenomic heterogeneity of the *rrn* ribosomal operon, which is due to homologous DNA recombination and horizontal gene transfer. It is noted that the pangenome concept has important implications for the interpretation of the taxonomic data generated by use of diverse phylogenetic markers, related to the pangenome's basic and mobile components. The possibility is discussed of using results of complete genome sequencing of the DNA of bacterial strains to go beyond the use of individual genes or even limited gene groups as phylogenetic markers. With *Azospirillum* bacteria as an example, the article shows the author's estimates of the intragenomic heterogeneity of the 16S rRNA sequences and the results from the use of a set of phylogenetic tests based on complete genome data within the limits of microbial genomic taxonomy, explicated in several publications. The dependence is found of an estimate of the systematic position of strains on the type of complete genome data used (i.e., whether they are related to the pangenome's basic component or to its basic and mobile components). It is noted that until conditions are achieved that would ensure complete genome sequencing of prokaryotic DNA on a scale sufficient to fill the relevant databases, the most correct approach will remain to be the polyphasic one. It is the kind of approach that combines diverse molecular-genetic tests with studies of the chemotaxonomic, physiological, and cultural properties of the isolated bacteria.

Keywords: prokaryotes, systematics, phylogenetic markers, pangenome, complete genome sequencing, genomic taxonomy.

К ВОПРОСУ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ФИЛЬТРАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

Е.Г. АБРАМОВА*, А.Г. СЕЛЕЗНЕВА, И.М. ЖУЛИДОВ, Р.А. СВИНЦОВ, С.В. ГЕНЕРАЛОВ,
Л.В. САВИЦКАЯ, О.А. ЛОБОВИКОВА, А.К. НИКИФОРОВ

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

Рассмотрены вопросы применения отечественных фильтроматериалов в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Показано, что разработанная модульная система предварительной и стерилизующей фильтрации полуфабриката не уступает по эффективности применяемой ранее схеме каскадной фильтрации с использованием фильтров зарубежного производства. Эффективность фильтрационного каскада подтверждена в контрольных испытаниях показателей качества препарата в соответствии с требованиями нормативной документации.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, глубокий фильтр, капсульный мембранный фильтр, стерилизующая фильтрация.

Введение

На современном этапе производства иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) актуальным является переход к использованию отечественных фильтрационных материалов на этапах очистки и стерилизации полуфабрикатов. К высококачественным в российском здравоохранении ИЛП относится гетерологичный антирабический иммуноглобулин (АИГ) производства РосНИПЧИ «Микроб», применяемый для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей при укусах больными или подозрительными на бешенство животными [8]. Качество выпускаемого в РосНИПЧИ «Микроб» антирабического иммуноглобулина во многом определяется эффективностью комплекса применяемых на производстве баромембранных процессов по очистке и стерилизации полуфабриката. Разработанная ранее специалистами института уникальная система каскадной фильтрации раствора иммуноглобулина обеспечивает его эффективную очистку от балластных примесей и стерилизацию, однако уязвимым местом данной схемы является использование на этапах удаления гемпигмента, депиро-

генизации и стерилизации препарата фильтрационных материалов зарубежного производства [2]. Российские производители материалов для микрофильтрации, проводя политику импортозамещения, в последнее время значительно расширили линейку выпускаемых изделий, одновременно ужесточив требования к их качеству на уровне мировых стандартов, что явилось предпосылкой для проведения поиска эффективных конкурентоспособных отечественных материалов для фильтрации АИГ [3]. Для решения указанной задачи нам предстояло определиться с типом фильтра (глубокий, мембранный), формой фильтрационного модуля (диски, патрон, капсула) и подобрать оптимальный микронный рейтинг материала, на основе которого изготовлен фильтроэлемент.

Цель работы — разработка эффективной модульной системы очистки и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина с применением фильтрационных материалов отечественных производителей.

Материалы и методы

В работе использовали раствор антирабического иммуноглобулина с содержанием белка $10 \pm 1\%$, рН $7,0 \pm 0,4$, приготовленный в соответствии с промышленным регламентом ПР № 01898109-47-15 на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций. Осадок гамма-глобулина, выделенный риванол-спиртовым методом, разводили 0,9%-ным раствором хлористого натрия, приготовленным на воде для

© 2018 г. Абрамова Е.Г., Селезнева А.Г., Жулидов И.М., Свинцов Р.А., Генералов С.В., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

Абрамова Елена Геннадьевна

кандидат биологических наук, зав. лабораторией профилактических иммуноглобулинов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

E-mail: akn7@yandex.ru

инъекций (ФС.2.2.0019.15). Для получения воды для инъекций использовали установку приготовления воды для инъекций УВИ-0,15 (АОЗТ «Мембранная техника и технология», Россия).

Фильтрующие патронные мембранные элементы ЭПМ.К-080/045-Д-250М, ЭПМ.К-045/020-Д-250М, ЭПМ.К+-0,45/0,20-Д-250М («Технофильтр», Россия) применяли для предварительной фильтрации. Осветляющую фильтрацию проводили с использованием предварительных дисковых картонных угольных фильтров ФПК («Владисарт», Россия) и Zeta carbon («CUNO», Франция). Мембранные сорбенты КФМ.К+-045/020-К-125 и КФМ.К+-020/020-К-125 («Технофильтр», Россия) были апробированы при депирогенизации полуфабриката. Стерилизующую фильтрацию осуществляли с использованием капсульных фильтров КФМ.ПС-045/020-К-125, КФМ.К-045/020-К-125, КФМ.К-020/020-К-125, КФМ.К+-045/020-К-125, КФМ.К+-020/020-К-125 («Технофильтр», Россия) и Sartobran P 0,45/0,20 («Sartorius», Германия).

На подготовительном этапе осуществляли проверку целостности фильтров и стерилизацию собранных фильтрационных систем автоклавированием под давлением $0,11 \pm 0,01$ МПа при температуре 121 ± 1 °С в течение 30 мин в стерилизаторе паровом электрическом ВК-75 (ОАО «Тюменский завод медоборудования и инструментов», Россия).

Баромембранные процессы осуществляли при давлении $0,03 \pm 0,01$ МПа. Во избежание образования слоя геля на поверхности мембран и закупорки ее пор раствор белка предварительно подогрели до 37 ± 1 °С и поддерживали температуру раствора на протяжении всего процесса фильтрации.

Определение цветности АИГ осуществляли спектрофотометрическим методом согласно фармакопейной статье ФС 42-3874-99 [15] с помощью колориметра фотоэлектрического концентрационного КФК-2МП при длине волны 400 нм (максимум поглощения гемоглобина).

Испытания на пирогенность проводили биологическим методом на кроликах согласно фармакопейной статье предприятия ФС П N002639/01-250210 «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций». Экспериментальные животные содержались в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [6] и Приказом № 199н от 01 апреля

2016 г. «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» [9].

Определение стерильности АИГ проводили методом прямого посева согласно ФС П N002639/01-250210 «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций».

Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартным методикам [4] с вычислением средней арифметической (M); средней ошибки средней арифметической (m). Вычисления проводили с использованием программ Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation) и Statistica 6 (Statsoft Inc.).

Результаты и обсуждение

Баромембранные процессы в производстве антирабического иммуноглобулина можно разделить на предварительные, целью которых является очистка раствора иммуноглобулина от балластных примесей, и финишные, обеспечивающие стерилизацию продукта. К предварительному этапу относится осветляющая фильтрация раствора иммуноглобулина, во время которой происходит удаление гемпигмента и достижение показателя цветности, удовлетворяющего требованиям нормативной документации на препарат. Согласно ФС П, данный показатель не должен превышать 0,15 опт. ед. Традиционно для коррекции цветности белковых фармацевтических растворов применяются глубинные фильтры на основе активированного угля; в частности, при производстве антирабического иммуноглобулина для этих целей используются дисковые картонные фильтры Zeta Carbon (CUNO, Франция). Для подбора отечественного аналога были изучены фильтрационные материалы глубинного типа для фармацевтической промышленности, выпускаемые в Российской Федерации. В результате проведенного поиска было выявлено, что компания «Владисарт» производит предварительные угольные картонные фильтры ФПК. Данные фильтры характеризуются повышенной адсорбционной способностью благодаря наличию в них частиц активированного угля и рекомендованы производителем для проведения предварительной фильтрации с целью коррекции цветности фармацевтических растворов. В эксперимент по изучению эффективности осветляющей фильтрации с использованием отечественных дисков ФПК в сравнении с импортными аналогами был взят раствор антирабического иммуноглобулина с показателем цветности $0,37 \pm 0,01$ опт. ед. Результаты испытаний представлены в таблице 1.

**Результаты сравнительных испытаний картонных фильтров с активированным углем
для удаления гемпигмента из раствора антирабического иммуноглобулина**

Фильтр	Производитель	Тип фильтра	Условия проведения фильтрации	Показатель цветности, опт. ед. (требование НД – не более 0,15)	
				до фильтрации	после фильтрации
ФПК	Владисарт, Россия	глубинный дисковый, 142 мм	температура раствора – 37 ± 1 °С, давление – 0,03 МПа	0,37±0,001	0,041±0,001
Zeta Carbon	CUNO (3M Purification, США, Франция)	глубинный дисковый, 142 мм			0,026±0,002

Как свидетельствуют данные таблицы 1, по окончании фильтрации с использованием глубинных фильтров двух производителей были получены растворы с показателями цветности, соответствующими требованиям ФСП на антирабический иммуноглобулин. Полученные результаты позволяют говорить о возможности замены дорогостоящих импортных фильтров CUNO на угольные картонные предварительные фильтры ФПК («Владисарт», Россия) для удаления гемпигмента из раствора антирабического иммуноглобулина на этапе проведения осветляющей фильтрации.

Следующим этапом фильтрационного каскада по очистке и стерилизации иммуноглобулина является депирогенизирующая фильтрация, задача которой состоит в удалении эндотоксинов из раствора иммуноглобулина. Для эффективной депирогенизации полуфабриката ранее нами была разработана схема с использованием модифицированных глубинных фильтров Zeta Plus (CUNO, Франция) на основе диатомита с двойным сорбционным механизмом — за счет положительного Zeta-потенциала на поверхности фильтра и сорбции в глубине матрикса [1]. При решении проблемы поиска аналога данного фильтра наше внимание привлек относительно новый класс отечественных мембранных материалов — положительно заряженных мембранных микрофильтров, изготовленных из модифицированного полиамида. Надо отметить, что полиамиды занимают одно из первых мест в производстве мембран для микрофильтрации, что обусловлено такими свойствами этого материала, как термостабильность, инертность, гидрофильность, устойчивость к химической нагрузке, малое содержание экстрагируемых веществ [5, 12]. По данным производителя, модифицированные сорбирующие мембраны, изготовленные из полиамида (nylon₆₆₊₆) с положительно заряженными функциональными группами, обладают положительным Zeta-потенциалом от 4 до 40 мВ. Особенность такого

микрофильтра заключается в том, что он поверхностно модифицирован с целью придания ему сорбционных свойств и, по сути, может являться депирогенизирующей полимерной мембраной.

Основная функциональная нагрузка при фильтрации через мембранный сорбент ложится не на межструктурные пространства — поры, ответственные за эффективность удержания частиц по размерам, а на поверхность структурных элементов. Если в обычных мембранах преобладает ситовый механизм задержания, то в заряженных — электростатический, что дает возможность задерживать микрочастицы значительно меньших размеров, чем диаметр пор микрофильтра, например, пирогены массой 10–20 кДа [10].

Таким образом, при выборе аналогов глубинных фильтров с Zeta-потенциалом мы остановились на фильтрационных элементах на основе сорбирующих мембранных микрофильтров («Технофильтр», Россия). Надо отметить, что продукция этого российского производителя, а именно: патронные элементы на основе обычных мембран с ситовым механизмом используются нами для первой ступени предварительной фильтрации уже более 10 лет, но в данном случае научный и практический интерес представляли экспериментальные исследования по эффективности применения модифицированных мембранных сорбентов на этапе депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина.

Решив задачу по выбору депирогенизирующего фильтра, далее необходимо было определиться с типом фильтрационного модуля и размером пор его основы — мембранного сорбента. Оптимальным фильтроэлементом, на наш взгляд, служат фильтрационные капсулы на основе модифицированной мембраны, которые с недавнего времени появились в ассортименте ООО НПП «Технофильтр» [13]. В эксперименте использовали фильтрационную капсулу КФМ.К+ с двуслойным

мембранным сорбентом с размером пор 020/020 мкм высотой 125 мм, представляющую собой неразъемный фильтр, состоящий из внешнего полипропиленового корпуса с запрессованным в него фильтропатроном. Потери продукта при фильтрации через указанный фильтр, как показал эксперимент, весьма незначительны — $0,42 \pm 0,02\%$. Выбор сорбента с размером пор 020/020 мкм обусловлен тем, что к этапу депирогенизации раствор иммуноглобулина проходит стадии двухступенчатой предварительной осветляющей фильтрации, организованной по принципу каскада через патронные элементы 0,80/0,45 и 0,45/0,20 мкм; его нагрузка, в том числе микробиологическая, сведена к минимуму.

Результаты эксперимента подтвердили наш правильный выбор, поскольку капсулы «справились» с предложенным объемом трудно фильтруемого белкового раствора. Для изучения эффективности мембранного сорбента в отношении удержания пирогенов в работу был взят раствор иммуноглобулина с показателем пирогенности $3,2 \pm 0,1$ °С, превышающим предельно допустимый по НД уровень более чем в 2 раза. Эффективность фильтра оценивали по показателю пирогенности пропущенного через него раствора. После однократной фильтрации пирогенного раствора через капсулу КФМ.К+-020/020-К-125 (способ 1) нам не удалось снизить первоначальный показатель пирогенности до порогового уровня, в испытаниях на кроликах регистрировали значение пирогенности $1,8 \pm 0,2$ °С.

Для повышения эффективности процесса депирогенизации было решено добавить использование мембранного сорбента на стадии предварительной фильтрации. Ранее для этой цели применяли последовательную фильтрацию через два патрона ЭПМ.К-080/045 и ЭПМ.К-045/020. Несколько видоизменив фильтрационный каскад, мы апробировали на этой стадии фильтр с Zeta-потенциалом: вместо традиционно используемого патронного элемента с мембраной 0,45/0,20 мкм применили такой же 10" патрон, но на основе мембранного сорбента ЭПМ.К+-045/020 (способ 2). В результате двухэтапной очистки через мембранные сорбенты значение пирогенности снизилось до порогового уровня и составило $1,4 \pm 0,1$ °С. Учитывая, что содержание пирогенов в растворе иммуноглобулина после завершения первичного цикла все же имело значение, близкое к пороговому, продукт еще раз подвергали очистке с использованием капсулы КФМ.К+-020/020-К-125 (способ 3). В результате трехкратной депирогенизирующей фильтрации значение пирогенности раствора иммуноглобулина, подаваемого для розлива в первичную упаковку, составило $1,1 \pm 0,1$ °С (рис. 1).

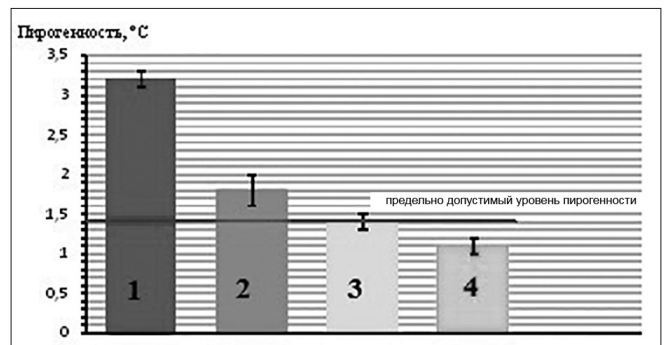


Рис. 1. Эффективность депирогенизации раствора антирабического иммуноглобулина с использованием отечественных мембранных сорбентов «Технофильтр». 1 — до фильтрации; 2 — способ 1; 3 — способ 2; 4 — способ 3

Таким образом, испытание мембранных сорбентов на основе двуслойной модифицированной полиамидной мембраны с размерами пор 045/020 и 020/020 мкм позволило рекомендовать их для депирогенизирующей очистки иммуноглобулина от пирогенов взамен глубинных фильтров фирмы CUNO с Zeta-потенциалом зарубежного производства.

Дальнейшим этапом исследований являлась экспериментальная оценка отечественных фильтров для проведения баромембранного процесса по стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина. Стерилизация — это финальная процедура в схеме очистки продукта, предполагающая практически абсолютное удаление из продукта микроорганизмов, в отличие от стадии депирогенизации, где мы добиваемся снижения концентрации пирогенов до безопасного уровня. Эффективность баромембранного процесса по стерилизации во многом зависит от двух факторов. Во-первых, продукт, а в данном случае это раствор антирабического иммуноглобулина, должен быть максимально очищен от контаминантов на предыдущих стадиях очистки. Этот принцип соблюден нами благодаря применению нескольких фильтров в цепи фильтрационного каскада: патронных и капсульных фильтров с микронным рейтингом от 0,80 до 0,20 мкм. Во-вторых, на данном этапе должны использоваться исключительно стерилизующие фильтры, а к ним можно отнести отнюдь не все фильтры с размером пор 0,20 мкм [14]. Международно признанная формулировка названия стерилизующего фильтра включает в себя определение, согласно которому стерилизующий фильтр должен гарантировать отсутствие в фильтрате микроорганизмов после нанесения на фильтр как минимум 10^7 клеток бактерий *Brevundimonas diminuta* на 1 см^2 рабочей площади фильтра. До недавнего времени отсутствие именно этого валидационного теста

ограничивало использование отечественных фильтров для стерилизации инъекционных растворов.

В экспериментах по стерилизации антирабического иммуноглобулина были использованы фильтрующие элементы капсульного типа с двуслойными мембранами от «Технофильтр»: КФМ.К-0,45/0,20; КФМ.К-0,20/0,20; КФМ.ПС-0,45/0,20. Кроме того, для стерилизации продукта были апробированы и описанные выше мембранные сорбенты КФМ.К+-0,45/0,20 и КФМ.К+-0,20/0,20. Важно, что предприятие-изготовитель фильтров проинформировало производителей лекарственных средств, что тест на эффективность удержания тест-культуры *B. diminuta* в концентрации 10^7 клеток на 1 см^2 площади фильтра включен в программу квалификационных испытаний стерилизующих фильтров на производстве, согласно Руководству по валидации [11].

Эффективность процесса оценивали по критерию стерильность раствора антирабического иммуноглобулина

после фильтрации. Образцом для сравнения служила стерилизующая капсула Sartobran P зарубежного производства с мембранным фильтром на основе ацетата целлюлозы, довольно часто используемая в производстве лекарственных иммунобиологических препаратов [7]. Результаты тестирования представлены в таблице 2.

Как показали результаты экспериментов, отечественные стерилизующие капсулы по эффективности процесса стерилизации не уступали фильтроэлементу Sartobran P, обеспечив стерильность раствора на заключительном этапе фильтрационного каскада. Использование на финальной стадии очистки иммуноглобулина капсульных элементов на основе модифицированного капрона КФМ.К+-0,20/0,20 позволяет совместить стерилизацию и дополнительную депирогенизацию. На завершающем этапе стерилизации иммуноглобулина предпочтительнее использование элементов с минимальным размером пор 0,20/0,20 мкм для обеспечения высокого запаса надежности на столь критичной стадии технологического процесса.

Таблица 2

Результаты испытаний фильтроэлементов капсульного типа отечественного производства при стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина

Тип фильтрующего капсульного элемента	Производитель	Средний размер пор мембраны, мкм	Материал мембраны	Количество положительных испытаний на целостность мембраны, %	Число проведенных исследований n / Количество стерильных процедур, %
Sartobran P	«Sartorius», Германия	0,45/0,20	Ацетат целлюлозы	100	10 / 100
КФМ.ПС	ООО НПП «Технофильтр», Россия	0,45/0,20	Полисульфон	100	10 / 100
КФМ.К+		0,20/0,20	Модифицированный полиамид (Nylon-6+ Nylon-66) с положительным Zeta-потенциалом	100	10 / 100
КФМ.К+		0,45/0,20	Полиамид	100	10 / 100
КФМ.К		0,20/0,20		100	10 / 100
КФМ.К		0,45/0,20		100	10 / 100
КФМ.К		0,45/0,20		100	10 / 100

Заключение

Таким образом, проведенные исследования экспериментально доказывают, что глубинные и мембранные фильтры российских производителей «Владисарт» и «Технофильтр» являются приемлемой альтернативой использованию дорогостоящих импортных фильтроматериалов. Для осветления, депирогенизации и стерилизации раствора антирабического иммуноглобулина разработана модульная система очистки, состоящая из следующих технологических процедур с использованием фильтров отечественного производства: предварительная

осветляющая фильтрация через патронные мембранные элементы ЭПМ.К-0,80/0,45 и модифицированные ЭПМ.К+-0,45/0,20 («Технофильтр»), далее очистка на предварительных глубинных угольных фильтрах ФПК диаметром 142 мм («Владисарт»), двукратная фильтрация через мембранные сорбенты капсульного типа КФМ.К+-0,20/0,20 («Технофильтр»), совмещающая депирогенизацию и стерилизацию препарата. Эффективность фильтрационного каскада подтверждена в контрольных испытаниях показателей качества препарата в соответствии с требованиями нормативной документации на антирабический иммуноглобулин.

Литература

1. Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Жулидов И.М., Селезнева А.Г., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А., Генералов С.В. Оптимизация депирогенизирующей фильтрации раствора гетерологичного антирабического иммуноглобулина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2015. — Т. 11. — № 1. — С. 34–38.
2. Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Михеева Т.А., Жулидов И.М., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Савицкая Л.В., Селезнева А.Г., Свинцов Р.А., Генералов С.В., Шульгина И.В. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина — итоги первых пяти лет // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 3. — С. 58–62.
3. Астахов Б.Ю., Котова А.Ю., Колганова И.М. Импортзамещение в микрофильтрации // Фармацевтические технологии и упаковка. — 2015. — № 6. — С. 94–98.
4. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Медгиз, 1962. — 180 с.
5. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В., Ланцова А.В., Оборотова Н.А. Применение мембранных фильтров в технологии получения стерильных лекарственных препаратов // Химико-фармацевтический журнал. — 2016. — Т. 50. — № 1. — С. 28–32.
6. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Серии европейских договоров — № 123 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://rm.coe.int/168007a6a8>.
7. Комиссаров А.В., Комоско Г.В., Лещенко А.А., Луб М.Ю., Пименов Е.В., Дармов И.В., Климов В.И., Логвинов С.В. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибирезязвенного лошадиного глобулина // Биотехнология. — 2002. — № 2. — С. 66–74.
8. Мовсисянц А.А., Бутырский А.Ю., Бондарев В.П., Олещук Ю.В., Постнова Е.Л., Мухачева А.В. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2015. — № 5(84). — С. 85–89.
9. Правила надлежащей лабораторной практики: [приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01 апреля 2016 г.] [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://depr.mos.ru/upload_local/iblock/fd4/fd4ba77acfb4fee7094a6c681e97c02e/prikaz_minzdrava_rossii_ot_1_aprelya_2016_g_n_199n.pdf.
10. Тарасов А.В., Ситников А.Г., Демидова В.В., Яворская Е.С. Мембранные микрофильтры для удаления бактериальных эндотоксинов с целью получения апиrogenной воды и водных растворов // Фармацевтические технологии и упаковка. — 2013. — № 5. — С. 110–111.
11. Тарасов А.В., Тарасова С.А., Андреев С.В., Рогожкин Е.В., Кондрашников Д.О., Яворская Е.С. Валидация процесса стерилизующей фильтрации в производстве готовых лекарственных средств // Фармацевтические технологии и упаковка. — 2013. — № 6. — С. 124–125.
12. Тарасова С.А., Федотов Ю.А. Микрофильтрационные полиамидные мембраны и фильтрующие элементы на их основе в процессах осветления и стерилизации жидких лекарственных форм // В кн.: Производство лекарств по GMP. — М.: Медицинский бизнес, 2005. — С. 153–158.
13. Тарасова С.А. Фильтрующие капсулы в производстве лекарственных препаратов // Фармацевтические технологии и упаковка. — 2014. — № 6. — С. 44–45.
14. Терентьев М.А. Мифы и грезы о стерилизующих фильтрах // Чистые помещения и технологические среды. — 2011. — № 2. — С. 38–41.
15. ФС 42-3874-99 Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья. — М.: МЗ РФ, 2000. — 77 с.

CONCERNING THE USAGE OF DOMESTIC FILTRATION MATERIALS IN MANUFACTURING OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN

E.G. ABRAMOVA, A.G. SELEZNEVA, I.M. ZHULIDOV, R.A. SVINTSOV, S.V. GENERALOV, L.V. SAVITSKAYA, O.A. LOBOVIKOVA, I.V. SHUL'GINA, A.K. NIKIFOROV

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

Considered are the issues of application of domestic filtration materials in manufacturing of heterologous anti-rabies immunoglobulin. It is demonstrated that the developed modular system for preliminary and sterilizing filtration of intermediate product is as effective as earlier used cascade filtration scheme deploying filters of foreign manufacture. Efficiency of the new filtration cascade is verified through control testing of preparation quality parameters in accordance with normative documentation requirements.

Keywords: anti-rabies immunoglobulin, screen filter, capsular membrane filter, sterilizing filtration.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

В.Б. БОРОДУЛИН¹, И.В. БАБУШКИНА^{2*}, Е.В. БОРОДУЛИНА¹,
Е.В. БОБЫЛЕВА¹, О.Э. ЛОСЕВ¹, Е.Г. ЧЕБОТАРЕВА¹

¹ ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского» Минздрава России,

² НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный
медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России

Проведено изучение распространенности клинических штаммов микроорганизмов для оценки их роли при гнойно-воспалительных осложнениях в травматолого-ортопедическом стационаре. Выявлена большая этиологическая значимость грам-отрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Pseudomonas*. Установлен высокий уровень резистентности клинических штаммов *P. aeruginosa* и *E. coli* к профильным антимикробным препаратам. Выделены плазмидные ДНК из 80 клинических штаммов грамотрицательных бактерий. Установлено, что среди изученных распространены штаммы, обладающие R-плазмидами, и проведено электрофоретическое исследование плазмидных ДНК. Изучена молекулярная масса плазмид, определены наиболее распространенные плазмидовары. Осуществлен рестрикционный анализ выделенных плазмидных ДНК, выявивший сходные рестрикционные фрагменты у штаммов различных таксономических групп. Плазмидная ДНК, обнаруженная в клинических штаммах микроорганизмов, является важным эпидемиологическим маркером, дополняющим традиционные микробиологические и биохимические методы идентификации бактерий. Использование молекулярно-генетического типирования возбудителей гнойно-воспалительных осложнений должно стать одним из основных методов при реализации программ борьбы с внутрибольничной инфекцией.

Ключевые слова: плазмиды, нозокомиальная инфекция, рестрикционный анализ, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

Введение

Повсеместное применение антибактериальных препаратов для лечения заболеваний различной этиологии способствует селекции и диссеминации антибиотикорезистентных микроорганизмов, что приводит к увеличению количества случаев гнойно-септических заболеваний. Выяснение причин возникновения и профилактики внутрибольничной инфекции является в настоящее время одной из актуальных проблем [6, 7].

С целью совершенствования микробиологического мониторинга нозокомиальных инфекций в лечебно-профилактических учреждениях рационально использовать не только выявление антибиотикоустойчивых штаммов

микроорганизмов и проведение их микробиологического, биохимического и серологического исследований, но также выделение и идентификацию плазмидных ДНК, содержащихся в этих штаммах. Постоянно действующая система мониторинга эпидемиологической обстановки может стать существенным звеном в борьбе с распространением госпитальных штаммов. Анализ плазмидных ДНК остается достаточно информативным методом, особенно при анализе острой вспышки внутрибольничной инфекции в стационаре [4, 6].

Роль R-плазмид в формировании госпитальных штаммов складывается из сообщения им резистентности к антибактериальным препаратам, а также из их способности мобилизовать неконъюгативные плазмиды патогенности и вирулентности за счет коинтеграции с этими плазмидами, что при селективном давлении антибиотиков создает условия, благоприятные для отбора полиплазмидных штаммов. Плазмиды также способны повышать резистентность микробной клетки к бактерицидному действию сыворотки крови, что наделяет клетку дополнительными селективными преимуществами [6, 8, 10, 14].

Детальное изучение плазмид позволяет определить источники и пути распространения внутрибольничной

© 2018 г. Бородулин В.Б., Бабушкина И.В., Бородулина Е.В., Бобылева Е.В., Лосев О.Э., Чеботарева Е.Г.

* **Автор для переписки:**

Бабушкина Ирина Владимировна,
к.м.н., старший научный сотрудник отдела фундаментальных и
клинико-экспериментальных исследований НИИТОН ФГБОУ
ВО «СГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России
410002 Саратов, ул. Чернышевского, 148
E-mail: 10051968@mail.ru

инфекции, вызванной бактериями различных видов. Изучение молекулярно-генетических свойств плазмид делает возможным определение источников и путей распространения внутрибольничной инфекции, вызванной бактериями различных видов. Решить эту задачу методами классической бактериологической диагностики не всегда возможно [2, 6, 9, 14].

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов, используемые в работе, коллекционировали и хранили в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности». Культуры хранили в холодильнике при температуре 2–8 °С на полужидком агаре (0,3%-ный Agar nutrient, Becton Dickinson, США) под стерильным вазелиновым маслом. Один раз в месяц проводили пересев микроорганизмов.

Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью анализатора микробиологического BVL Crystal Autoreader MD1K040, микроскопа лабораторного Микрос МС-300. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам проводили диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Для выделения плазмидных ДНК из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов использовали классический метод щелочного лизиса Бирнбойма – Доли [5, 11] и набор для выделения плазмидной ДНК ООО «Цитокин».

Электрофорез проводился в горизонтальной камере с трис-боратным буфером в 0,8% агарозном геле с добавлением этидия бромид в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Для приготовления агарозного геля использовали агарозу фирмы «Сметорол» (Чехия). Объем заполненной лунки – 20 мкл. После застывания геля наносили образцы плазмидной ДНК (15 мкл) с красителем для электрофореза (5 мкл) и тщательно перемешивали без образования пузырьков воздуха. Электрофорез проводился в два этапа: 1) предварительный электрофорез – 30 мин. при 20 V; 2) основной электрофорез – 4–12 часов при 40–120 V. Камеру для электрофореза заливали трис-боратным буфером. Гель фотографировали при помощи оранжевого светофильтра с экспозицией 10–30 мин. В качестве маркеров молекулярных масс были применены следующие плазмиды: pUC-19 (1,8 МДа), pBR-322 (2,9 МДа), pBR-325 (4 МДа), p8A

(23 МДа), pR-386 (78 МДа), pRTSI (120 МДа). Для контроля хромосомной ДНК использовали бесплазмидный штамм *E. coli* HB101.

Проведен рестрикционный анализ выделенных плазмидных ДНК. Предварительную очистку суммарной плазмидной ДНК проводили в двухфазной системе ПЕГ-6000-декстран 500. Гидролиз ДНК рестриктазами проводили по Маниатису [1, 3], использовали следующие рестриктазы: *Bspl*, *BspRI*, *BcnI*. Анализ рестриктных фрагментов проводился в 10% и 15% полиакриламидных гелях на ТВЕ буфере.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения количественных показателей выполняли с применением критерия Колмогорова – Смирнова, коэффициентов асимметрии и эксцесса. Оценку различий между выборками проводили с использованием t-критерия Стьюдента, так как переменные соответствовали нормальному распределению.

В анализе использованы следующие статистические показатели:

n – число наблюдений;

M – среднее арифметическое значение;

m – среднеквадратическая ошибка;

p – коэффициент достоверности.

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

Результаты

В условиях стационара травматолого-ортопедического профиля в 2016–2017 гг. было проведено исследование клинических штаммов микроорганизмов для оценки их этиологической значимости при гнойно-воспалительных осложнениях. При анализе данных бактериологического обследования пациентов с гнойно-воспалительными осложнениями установлено, что у 37% пациентов они протекали с участием грамотрицательных бактерий, что подтверждает их большое значение в возникновении инфекционных осложнений в травматологии и ортопедии. Среди грамотрицательных микроорганизмов значительную часть изолятов составили представители семейства энтеробактерий и рода *Pseudomonas* (суммарно около 86%). Другие грамотрицательные бактерии (в основном – рода *Acinetobacter*) встречались значительно реже.

Грамположительные микроорганизмы являлись возбудителями гнойно-воспалительных осложнений

в 69% случаев. Среди грамположительных бактерий наибольший удельный вес имели коагулазоположительные и коагулазонегативные стафилококки — 60%; *Enterococcus ssp.* и *Streptococcus ssp.* обнаружены у 5 и 7% соответственно. Другие группы микроорганизмов (*Candida ssp.*, представители рода *Corinebacterium* и др.) являлись возбудителями гнойных осложнений менее чем у 5% пациентов.

Значительный удельный вес среди этиологических агентов имеют представители семейства *Enterobacteriaceae* — 63%, рода *Pseudomonas* — 37% от общего количества штаммов грамотрицательных бактерий. Соотношение наиболее значимых групп микроорганизмов представлено на рисунке 1.

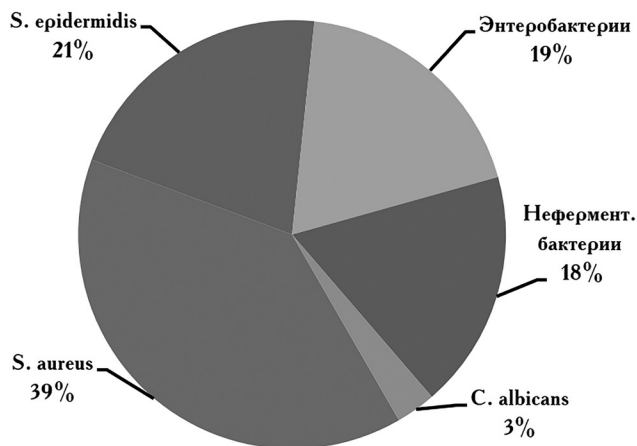


Рис. 1. Этиологическая значимость микроорганизмов в возникновении гнойно-воспалительных осложнений в травматолого-ортопедическом стационаре

Нами изучено 80 штаммов наиболее этиологически значимых групп грамотрицательных бактерий — 40 штаммов рода *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*) и 40 штаммов, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae* (*E. coli*), полученных от пациентов травматолого-ортопедического стационара.

Исследована чувствительность клинических штаммов *P. aeruginosa* и *E. coli* к 11 антимикробным препаратам следующих групп: β -лактамы, аминогликозиды, хинолоны. Установлен высокий уровень резистентности клинических штаммов микроорганизмов к профильным антибиотикам. Анализ данных показал устойчивость 32 из 40 исследуемых штаммов *E. coli* и 36 из 40 клинических штаммов *P. aeruginosa* к 5 и более антибактериальным профильным препаратам. Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам различных групп продемонстрирована на рисунке 2.

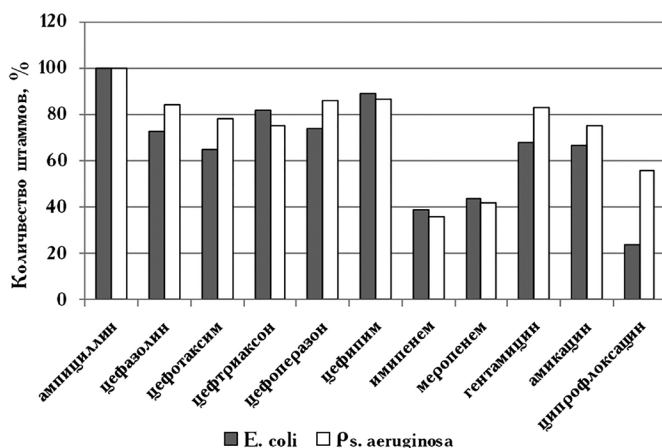


Рис. 2. Чувствительность клинических штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa* к антибиотикам

Как видно из приведенной на рисунке 2 диаграммы, все исследуемые штаммы *E. coli* устойчивы к пеницилину расширенного спектра действия (ампицилину). Резистентность к цефалоспорином определена у 73–89% штаммов микроорганизмов в зависимости от препарата. Выявлена устойчивость штаммов *E. coli* к аминогликозидам — 67–68% штаммов показали устойчивость к амикацину и гентамицину. Наиболее высокая активность в отношении штаммов *E. coli* наблюдалась у карбапенемов — 56–61% штаммов были чувствительны к имипенему и меропенему — и хинолонов: 76% штаммов чувствительны к ципрофлоксацину.

Также проведен анализ чувствительности к антибиотикам 40 штаммов *P. aeruginosa*. Диаграмма рисунка 2 показывает, что наибольший уровень резистентности штаммов *P. aeruginosa* наблюдали в отношении β -лактамы антибиотиков. Только 13–22% штаммов микроорганизмов оказались чувствительными к цефалоспорином. Наиболее высокой активностью в отношении штаммов *P. aeruginosa* из группы β -лактамы антибиотиков обладали карбапенемы (58% штаммов отнесены к чувствительным к меропенему, 64 — к имипенему). Кроме того, определена чувствительность к аминогликозидам. Выявлено 83% штаммов, устойчивых к гентамицину, 75% — к амикацину. Чувствительность к хинолонам определяли в отношении ципрофлоксацина, установлена устойчивость 56% штаммов *P. aeruginosa*. В результате проведенных исследований выявлен высокий уровень резистентности клинических штаммов *P. aeruginosa* в отношении антибактериальных препаратов, наиболее часто используемых для лечения инфекций, вызванных данным возбудителем.

Проведено выделение и исследование плазмидных ДНК из 80 клинических штаммов грамотрицатель-

ных микроорганизмов, обладающих множественной антибиотикорезистентностью (*E. coli* и *P. aeruginosa*). Использовались классический метод щелочного лизиса Бирнбойма — Доли и набор для выделения плазмидной ДНК ООО «Цитокин». У 78% штаммов *E. coli* и 86% штаммов *P. aeruginosa* при электрофоретическом исследовании обнаружены плазмиды различных молекулярных масс. Электрофореграмма плазмидной ДНК штаммов *E. coli* представлена на рисунке 3.

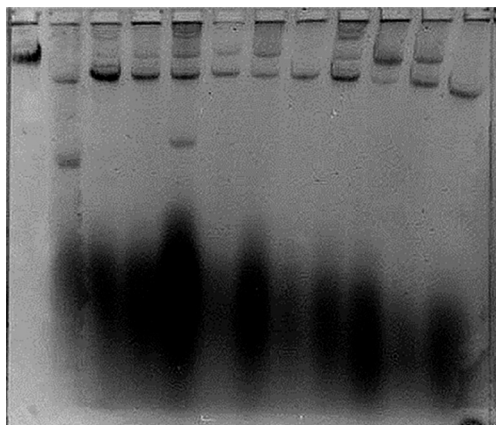
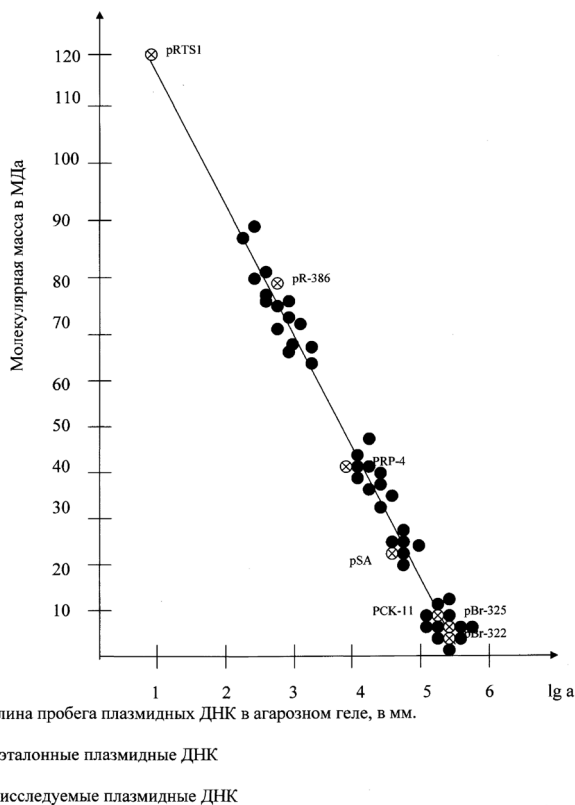


Рис. 3. Электрофореграммы ДНК из штаммов с 1–12 (слева направо): 1 — бесплазмидный штамм *E. coli* НВ-101; 2–12 — клинические штаммы *E. coli*

Анализ электрофореграмм нуклеосомной и плазмидных ДНК из клинических штаммов микроорганизмов позволяет сделать вывод о применимости ряда методов для идентификации электрофоретических профилей плазмидных ДНК в агарозном геле после использования соответствующей процедуры выделения генетического материала. Наиболее адаптированным методом остается методика Бирнбойма — Доли, которая может быть применима практически ко всем грамотрицательным клиническим штаммам микроорганизмов.

Один из этапов скрининга предусматривал оценку молекулярной массы плазмидных ДНК, выделенных из грамотрицательных штаммов микроорганизмов. Для этой цели можно в каждом эксперименте применять в виде контроля несколько образцов плазмидных ДНК с известной молекулярной массой и по длине пробега в агарозном геле судить о величинах молекулярных масс плазмид. Несколько иной подход заключается в том, что, подобрав стандартный режим (время, концентрацию агарозы, силу тока и т.д.) гель-фореза для контрольных и опытных образцов ДНК, в дальнейшем оценивать только длину пробега плазмид в агарозном геле и сравнивать данную длину в миллиметрах или сантиметрах с длиной пробега контрольных образцов плазмидных

ДНК. Подобные исследования позволяют достаточно точно судить о молекулярной массе плазмидных ДНК и делать выводы о том, какие преимущественно образцы плазмид — низко- или высокомолекулярные — содержатся в изучаемых бактериальных штаммах. Сравнение электрофоретических профилей плазмид между собой и с контрольными образцами является весьма корректной процедурой, поскольку обычно все образцы плазмид пребывают в сверхспирализованном конформационном состоянии. На рисунке 4 представлена взаимосвязь между длиной пробега и молекулярной массой плазмид в стандартных условиях.



a — длина пробега плазмидных ДНК в агарозном геле, в мм.

- ⊗ - эталонные плазмидные ДНК
- - исследуемые плазмидные ДНК

Рис. 4. Корреляция между величиной молекулярных масс плазмидных ДНК и длиной пробега плазмид в агарозном геле

Суммарные данные свидетельствовали о том, что у 22 штаммов *E. coli* присутствовала наиболее распространенная у энтеробактерий R-плаزمиды с молекулярной массой ориентировочно в 30 МДа, несущая гены резистентности к антибиотикам. 26 штаммов содержали вторую плазмиду величиной приблизительно в 80 МДа. Доминирующим был плазмидовар 80: 30 МДа — у 19 штаммов; менее распространен был плазмидовар II-30: 5,5 МДа — 11 штаммов; III плазмидовар содержал дополнительно к плазмидам с молекулярной массой 30 и 80 МДа крупную плазмиду величиной 180 МДа (3 штам-

ма); IV плазмидовар состоял из R-плазмиды в 30 МДа и еще одной крупной плазмиды 90 МДа (5 штаммов).

Проведен рестрикционный анализ выделенных плазмидных ДНК. Очистку суммарной плазмидной ДНК проводили в двухфазной системе ПЕГ-6000-декстран 500. При данном методе плазмидная ДНК практически полностью очищается от всех примесей и РНК. Она пригодна для дальнейших исследований. Гидролиз ДНК рестриктазами проводили по Маниатису [1, 3], использовали следующие рестриктазы: *Bspl*, *BspRI*, *VcnI*. Анализ рестриктных фрагментов осуществлялся в 10% и 15% полиакриламидных гелях.

На рисунке 5 представлена электрофореграмма рестриктных фрагментов исследуемых плазмид, проведенный в 10% полиакриламидном геле. Все штаммы имели линию хромосомной и плазмидной ДНК. РНК после очистки отсутствовала.

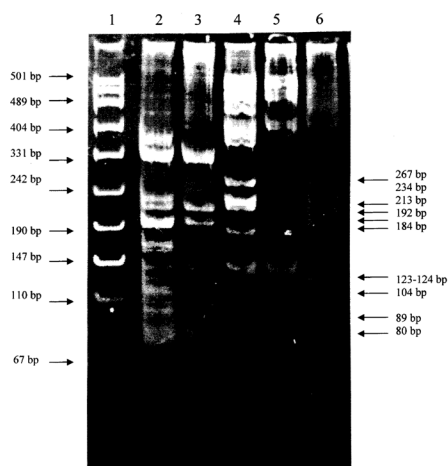


Рис. 5. Электрофореграмма рестриктных фрагментов плазмидной ДНК, выделенной из клинических штаммов *E. coli* и *Ps. aeruginosa* после гидролиза *BspRI* в 15%-ном ПААГ

По наборам фрагментов, полученных после обработки рестриктазами *BspRI*, *VcnI*, *Bspl*, рестрикционный анализ показал, что одна из плазмид *Ps. aeruginosa* pVN-345 совпадает с плазмидой pVN-662, выделенной из *E. coli*. Проводимые исследования электрофоретических профилей плазмидных ДНК и обнаружение сходства их молекулярных масс, а также подобия рестриктных полос ДНК на электрофореграмме должны нацелить на поиск путей контакта бактериальных штаммов между собой и, следовательно, выявление эпидемиологических путей передачи генетического материала от одного штамма к другому. Это явление, широко изучаемое в настоящее время [4, 6, 14], значительно снижает эффективность антибиотикотерапии.

Обсуждение

Проведено изучение распространенности клинических штаммов микроорганизмов для оценки их этиологической значимости при гнойно-воспалительных осложнениях в травматолого-ортопедическом стационаре. Выявлена большая этиологическая значимость грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Pseudomonas*. Изучена чувствительность клинических штаммов *P. aeruginosa* и *E. coli* к антимикробным препаратам следующих групп: β -лактамы антибиотики, аминогликозиды, хинолоны. Установлен высокий уровень резистентности клинических штаммов микроорганизмов к профильным антибиотикам.

Выполнено выделение плазмидных ДНК из клинических штаммов грамотрицательных бактерий. В результате проведенных исследований установлено, что среди изученных клинических штаммов грамотрицательных бактерий распространены штаммы, обладающие R-плазмидами, проведено электрофоретическое исследование плазмидных ДНК. Изучена молекулярная масса плазмид, определены наиболее распространенные плазмидовары. Проведен рестрикционный анализ выделенных плазмидных ДНК, выявивший сходные рестриктные фрагменты у штаммов различных таксономических групп.

Плазмидная ДНК, обнаруженная в клинических штаммах микроорганизмов, является важным эпидемиологическим маркером, который может дополнить традиционные микробиологические и биохимические методы идентификации бактерий в стационарах [12, 13]. Исследование плазмидных ДНК, выделенных из клинических штаммов, позволит с большей достоверностью определять штаммы, вызывающие внутрибольничные инфекции, а также выявлять пути распространения госпитальной инфекции в стационаре, и поможет разработать комплекс профилактических мероприятий для снижения уровня госпитальных инфекций.

Заключение

Создание банка данных по распространенности нозокомиальных штаммов и плазмидным ДНК позволит включиться в программы по обмену информацией о рестриктных сайтах ДНК, содержащихся в плазмидах, включая также и сайты известных R-плазмид. Молекулярно-генетическое типирование имеет большое значение при раскрытии эпидемиологических особенностей внутрибольничной инфекции. Использование молекулярных

методов типирования возбудителей должно стать одним из основных методов при реализации программ борьбы с внутрибольничной инфекцией.

Литература

1. Волова Т.Г., Кожевников И.В., Франк Л.А. и др. Большой практикум по биотехнологии : учебное пособие. — Красноярск: Краснояр. гос. ун-т, 2005. — 128 с.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — М.: Мир, 2002.
3. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. — 208 с.
4. Карабак В.И. Микробиологический мониторинг за возбудителями нозокомиальных инфекций (на примере отделений реанимации и интенсивной терапии) // Антибиотики и химиотерапия — 2000. — № 3. — С. 20–23.
5. Гловер Д. (под ред.). Клонирование ДНК. Методы. Пер. с англ. — М.: Мир, 1988. — 538 с.
6. Козлов Р.С. Селекция резистентных микроорганизмов при использовании антимикробных препаратов: концепция «параллельного ущерба» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2010. — Т. 12. — № 4. — С. 284–294.
7. Козлов Р.С., Голуб А.В. Стратегия использования антимикробных препаратов как попытка ренессанса антибиотиков // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2011. — Т. 13. — № 4. — С. 322–334.
8. Мейнелл Г. Бактериальные плазмиды. Пер. с англ. — М.: Мир, 1976. — 237 с.
9. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. Под ред. С. Харрингена, Дж. Макги. — М.: Мир, 1999. — 558 с.
10. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология. — М.: Академия, 2006. — 256 с.
11. Birnboim H.C., Doly S. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA // Nucleic Acids Res. — 1979. — Vol. 7(6). — P. 1513–1523.
12. Friehs K. Plasmid copy number and plasmid stability // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. — 2004. — Vol. 86. — P. 47–82.
13. Lee S.G., Liao J.C. Control of acetate production rate in *Escherichia coli* by regulating expression of single-copy pta using lacIQ in multicopy plasmid // J. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — Vol. 18. — No. 2. — P. 334–337.
14. Wolter D.J., Khalaf N., Robledo I.E. et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican medical center hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases // Antimicrob. Agents Chemother. — 2009. — Vol. 53(4). — P. 1660–1664.

Список сокращений:

МДа — мегадальтон;

ПЕГ — полиэтиленгликоль;

ПААГ — полиакриламидный гель;

R-плазмиды — плазмиды антибиотикорезистентности;

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

MOLECULAR MARKERS OF NOSOCOMIAL INFECTIONS

V.B. BORODULIN¹, I.V. BABUSHKINA², E.V. BORODULINA¹, E.V. BOBYLEVA¹, O.E. LOSEV¹,
E.G. CHEBOTAREVA¹

¹ V.I. Razumovsky Saratov State Medical University,

² Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov

A study was made of the prevalence of clinical strains of microorganisms to assess their role in purulent-inflammatory complications in the trauma and orthopedic hospital. A great etiological significance of gram-negative microorganisms of the *Enterobacteriaceae* family and the genus *Pseudomonas* has been revealed. The high level of resistance of clinical strains of *P. aeruginosa* and *E. coli* to profile antimicrobial agents was established. Plasmid DNA from 80 clinical strains of gram-negative bacteria was isolated. It was found that strains with R-plasmids were common among the studied strains and an electrophoretic study of plasmid DNA was carried out. The molecular mass of plasmids has been studied, the most common plasmidovars have been determined. Restriction analysis of isolated plasmid DNA was carried out, revealing similar restriction fragments in strains of different taxonomic groups. Plasmid DNA found in clinical strains of microorganisms is an important epidemiological marker, complementing the traditional microbiological and biochemical methods for identifying bacteria. The use of molecular-genetic typing of pathogens of purulent-inflammatory complications should become one of the main methods in the implementation of programs to combat nosocomial infection.

Keywords: plasmids, nosocomial infection, restriction analysis, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И СКОРОСТЬ ДЕГРАДАЦИИ ПЛЕНОК И ГЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ПРОДУЦИРУЕМОЙ *GLUCONACETOBACTER SUCROFERMENTANS*

Н.А. КЛЕНОВА*, Т.А. ОВЧИННИКОВА, Ю.А. МАРКОВА,
В.С. СОБОЛЕВА, Э.Ю. СОСОВА, А.Е. ЕРОФЕЕВА

ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева», Самара

В статье приводятся сведения о методах получения бактериальной целлюлозы в виде гелей, гель-пленок и «вторичных» пленок в разных условиях культивирования *Gluconacetobacter sucrofermentans* и описывается ряд их свойств. Использование данных материалов в качестве носителей для антибиотических соединений показало высокую эффективность «вторичных» пленок, когда они получают из гелей, которые способны хорошо адсорбировать и затем отдавать антибактериальные и антифунгальные вещества. Авторы изучают скорость деградации образцов бактериальной целлюлозы смешанной культурой агаролитиков в сравнительном аспекте и показывают сопоставимость ее с деградацией образцов растительной целлюлозы.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, гели, пленки, деградация.

Введение

Бактериальная целлюлоза (БЦ), продуцируемая представителями ацетобактерий, уже давно привлекает внимание биотехнологов, так как обладает рядом уникальных свойств: малым размером волокон, высокой гигроскопичностью, химической чистотой, отсутствием аллергенности и другими полезными качествами [4]. Условия получения и возможности применения данного полимера представляют значительный научно-практический интерес. Кроме того, необходимо учитывать тот факт, что в условиях распространения получения и использования бактериальной целлюлозы возникает проблема ее эффективной утилизации в природе.

Целью настоящего исследования стало получение, изучение свойств, использование пленок и гелей бактериальной целлюлозы в качестве носителя антибактериальных и антифунгальных соединений, а также определение скорости бактериальной деградации данных полимерных материалов.

Материалы и методы

С целью получения гелей и пленок бактериальной целлюлозы использовали культивирование штамма *Gluconacetobacter sucrofermentans* В-11267, любезно предоставленного нам сотрудниками кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского национального исследовательского университета им. Н.А. Огарева. Для получения гелей среда культивирования содержала 1% D-глюкозы, 1,5% пептона, 0,8% дрожжевого экстракта, 0,3% ледяной уксусной кислоты, рН 3,5 доводили с помощью соляной кислоты. Условия автоклавирования: 121 °С, 20 минут. После остывания в среду добавляли 0,5% этилового спирта [3]. Выращивание бактерий проводили при 30 °С и постоянном перемешивании в шейкере при 200 об/мин в течение 5 суток. Полученные гели отмывали деионизированной водой, затем помещали в 1,0 М раствор NaOH и выдерживали при 70 °С в течение 90 минут и вновь отмывали деионизированной водой до нейтральной реакции. Пленки получали, используя среду HS г/л: D-глюкоза — 20,0; дрожжевой экстракт — 5,0; пептон — 5,0; Na₂HPO₄ — 2,7; лимонная кислота — 1,15; рН 6,0. Автоклавируют в тех же условиях. Полученную пленку трехкратно обрабатывали 0,1 Н раствором NaOH при 80 °С в течение 30 минут для удаления клеток и компонентов культуральной жидкости, затем отмывали дистиллированной водой, раствором 0,5% уксусной кислоты и снова водой до нейтральной реакции. Высушивали в сушильном шкафу при 80 °С до постоянной массы [1].

© 2018 г. Кленова Н.А., Овчинникова Т.А., Маркова Ю.А., Соболева В.С., Сосова Э.Ю., Ерофеева А.Е.

* **Автор для переписки:**

Кленова Наталья Анатольевна

д.б.н., профессор

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П.

Королева, Самара

E-mail: klenova.ssu@yandex.ru

Механическую прочность и растяжение биопленок определяли в мПа (миллипаскаль) на разрывной машине (PARAM® XLW (PC) Auto Tensile Tester-Китай-США), а толщину образцов регистрировали на автоматическом толщиномере высокого разрешения (PARAM® CHY-C2-Германия).

Прочность, упругость и относительную деформацию при разрыве измеряли при одноосном растяжении образцов размером 2×20 мм со скоростью 5 мм/мин. Деформационно-прочностные характеристики рассчитывали по формулам:

$$\sigma_{\text{пч}} = \frac{F(H)}{A_0},$$

где $\sigma_{\text{пч}}$ — предел прочности;

F — сила тяжести, выражаемая в ньютонах (H);

A_0 — начальная площадь поперечного сечения испытуемого образца, выражаемая в квадратных миллиметрах (мм^2).

$$A_0 = \frac{\text{толщина образца (мм)}}{\text{ширина образца (мм)}}$$

Каждую величину получали усреднением значений 5 индивидуальных измерений [2]. Морфологическую характеристику изучали с использованием растрового электронного микроскопа FEI Quanta 200.

Образцы пленок и гелей использовали как носители антибиотических соединений. Пленки применяли высушенные до постоянного веса, гели — в виде «вторичных» пленок. В качестве антибиотических соединений использовали 0,2%-ный раствор клотримазола (дифенил-(2-хлорфенил)-1-имидазолметан (лекарственный препарат) и 0,5 %-ный раствор 2-амино-6-нитробензотиазола (зарегистрирован под номером CAS 6285-57-0) в 96%-ном этиловом спирте.

Образцы пленок площадью 0,25 см^2 , стерилизованные УФ-излучением, предварительно выдерживали в растворах антибиотических соединений 30 минут с перемешиванием в шейкере 100 об/мин при комнатной температуре. На основе гелей бактериальной целлюлозы готовили «вторичные пленки».

Для получения «вторичных» пленок на основе геля БЦ готовили по 10 мл суспензии геля БЦ с 0,5%-ным раствором 2-амино-6-нитробензотиазола в 96% этиловом спирте, либо 0,2%-ным раствором клотримазола. Перемешивали в шейкере-инкубаторе (Environmental Shaker-Incubator ES-20/60) 20 минут, режим перемешивания — 250 об/мин. Полученную смесь выкладывали в чашку Петри на полиэтиленовую пленку, оставляли до высыхания. Из полученной высушенной «вторичной» пленки вырезали образцы диаметром по 0,5 см.

В качестве тестовых микроорганизмов использовали суспензии суточного инокулята *Penicillium* sp. и *Escherichia coli* M-17. Образцы пленок помещали на свежие посевы. Культивирование осуществляли в термостате при 30 °С в течение четырех суток. Антибиотическая активность определялась по размерам и площади зон ограниченного роста тестовых микроорганизмов (диффузионный метод). Для расчета площади отсутствия роста образцы пленок удаляли с агара и чашки фотографировали. Площадь отсутствия роста рассчитывали, используя программу «Fractal Dimension Calculator». Достоверность результатов оценивали по критерию Стьюдента.

Деградиацию изучали, используя культивирование агаролитической культуры на минеральной среде Чапека в чашках Петри при комнатной температуре. Смешанная бактериальная культура была выделена из почвенного образца, отобранного из горизонта ВС (глубина залегания 116–184 см) почвенного профиля под смешанной дубравой на территории Красносамарского лесного массива Самарской области. Почвенные образцы до закладки опыта в течение 8 месяцев хранились при температуре +5 °С. Выделение смешанной культуры было произведено путем посева почвенной суспензии на минеральный агар Чапека. В ходе культивирования наблюдали разжижение агара. Очистка культуры на агаре Чапека методом Дригальского обнаружила присутствие целлюлозооксилирующих бактерий, относящихся к двум родам *Cellvibrio* (секвенировано по 16S РНК) и *Cytophaga* (определено по морфологическим признакам).

Образцы пленок бактериальной целлюлозы различной плотности и гели БЦ взвешивали, стерилизовали с помощью УФ-излучения и помещали в чашки с 20 мл среды. Затем чашки засеивали смешанной культурой целлюлозоразрушающих бактерий. Наблюдали, отмечая время полной дегградации образцов. С целью сравнения использовали также образцы фильтровальной бумаги и кальки.

Результаты и обсуждение

Культивирование *Gluconacetobacter sucrofermentans* В-11267 в зависимости от условий позволяет получить гели и гель-пленки бактериальной целлюлозы.

Высушенные пленки, полученные при культивировании штамма *Gluconacetobacter sucrofermentans* В-11267 на питательной среде HS, изучали по показателю прочности. Для испытаний использовались пленки с различной толщиной от 407,2 до 95,3 нм.

Механические испытания показали, что образцы биопленок имеют малую разрывную прочность, составля-

ющую 0,003 мПа (миллипаскаль). Средняя максимальная нагрузка равна 49,23 Н (ньютон) и относительное удлинение образца составляет 7%.

Изучение микроструктуры пленок БЦ методом растровой электронной микроскопии продемонстрировало, что пленки имеют складчатую структуру, с визуальной гладкой поверхностью, которая обеспечивает ее влагоудерживающую способность (рис. 1).

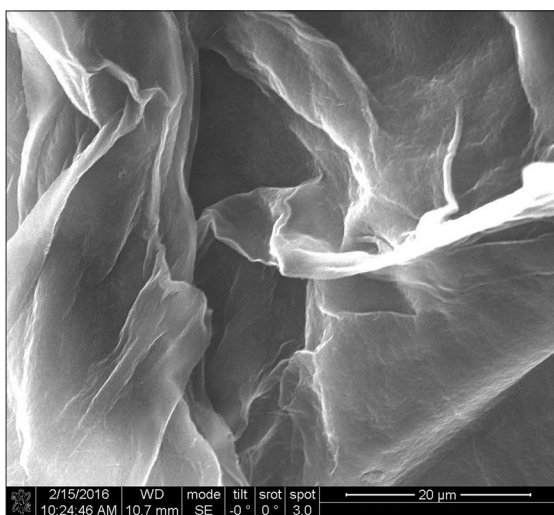


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия образцов сухих пленок бактериальной целлюлозы

Применение первичных и «вторичных» (из гелей) пленок бактериальной целлюлозы как носителей антибиотических соединений показало, что они эффективно подавляют рост тестовых микроорганизмов за счет диффузии антибиотиков в агар. Причем, использование пленок БЦ достоверно более эффективно, чем применение в качестве носителя кальки (табл. 1).

При использовании в качестве носителя клотримазола образцов бактериальной целлюлозы площадь зарастания чашек пропагулами пеницилла уменьшается на 17%, а зона отсутствия роста увеличивается на 31% по сравнению с калькой (см. табл.1).

Применение пленок БЦ, пропитанных раствором 2-амино-6-нитробензотиазола, выявило наличие антибактериального действия их по отношению к посевам *Escherichia coli*.

При использовании метода предварительной инкубации образцов БЦ в спиртовых растворах 0,2%-ного клотримазола и 0,5%-ного 2-амино-6-нитробензотиазола, а затем их высушивания и помещения на свежие посева *E. coli* мы наблюдали выраженную антибактериальную активность пленок БЦ с 2-амино-6-нитробензотиазолом, где площадь подавления роста *Escherichia coli* на третьи сутки культивирования на 37% больше, чем в контрольных образцах (табл. 2).

Таблица 1

Показатели задержки роста *Penicillium sp.* на плотной среде вокруг пленок, пропитанных лекарственным препаратом клотримазолом 0,2%, на 3-е сутки культивирования

Проба	Диаметр зоны ограничения роста, мм	Площадь зарастания чашек, %	Зоны отсутствия роста, см ²
Калька + клотримазол	34,06±0,57	57,42±0,06	9,12±0,01
Калька + спирт 96% (контроль)	зарастание	100	-
БЦ + клотримазол	39,00±0,30*	47,81±1,60*	11,96±0,03*
БЦ + спирт 96% (контроль)	зарастание	100	-

Примечание: * $p < 0,01$ по отношению к пленкам бактериальной целлюлозы

Таблица 2

Зоны задержки роста *E. coli* (3-е сутки культивирования) на плотной среде вокруг пленок БЦ с 2-амино-5-нитробензотиазолом и клотримазолом

Проба	Диаметр зоны ограничения роста, мм	Площадь зарастания чашек, %	Зоны отсутствия роста, см ²
Контроль: БЦ + спирт 96%	10,75±0,09	24,87±0,01	2,88±0,01
БЦ + клотримазол	14,75±0,09*	18,12±0,01* ^Δ	3,95±0,01* ^Δ
БЦ + 2-амино-6-нитробензотиазол	12,50±0,35*	21,49±0,04* ^Δ	3,35±0,06*

Примечание: * $p < 0,01$ по отношению к пленкам БЦ; ^Δ $p < 0,01$ по отношению к БЦ+2-амино-6-нитробензотиазол

Антибактериальное действие 0,2%-ного спиртового раствора клотримазола в составе пленок БЦ оказывается выше, чем 0,5%-ного спиртового раствора 2-амино-6-нитробензотиазола, на 18% (см. табл. 2).

Предварительное выдерживание образцов БЦ в спиртовых растворах клотримазола (0,2%) и 2-амино-6-нитробензотиазола (0,5%) и помещение их далее на свежие посевы *Penicillium* sp. на среде Чапека не выявило роста грибных пропагул на 9-е сутки культивирования при 30 °С (рис. 2; А и Б). В то время как на контрольных чашках, где находились образцы, выдержанные в 96%-ном этиловом спирте, мы наблюдали интенсивный рост грибных пропагул уже на 6-е сутки культивирования (рис. 2; В).

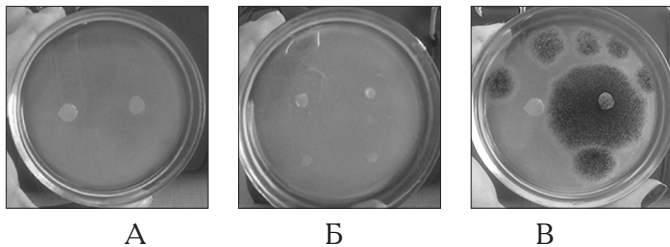


Рис. 2. Образцы БЦ с клотримазолом (А); образцы БЦ с 2-амино-6-нитробензотиазолом (Б); контроль (В)

Таким образом, антибактериальное действие 0,2%-ного спиртового раствора клотримазола по отношению к *E. coli* оказывается достоверно выше, чем у 0,5%-ного раствора 2-амино-6-нитробензотиазола, тогда как их антифунгальное действие сопоставимо.

«Вторичные» пленки БЦ с клотримазолом показали абсолютное подавление роста *Penicillium* sp. и на третьи сутки культивирования, и в течение последующих трех недель, по сравнению с контрольными пленками БЦ, в которых практически сплошной газонный рост отмечался уже на третьи сутки культивирования (рис. 3).

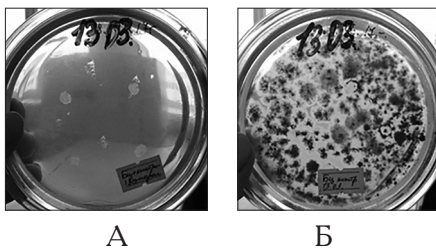


Рис. 3. Внешний вид чашек с ростом грибных пропагул: А. «Вторичные пленки», содержащие клотримазол; Б. «Вторичные пленки» с пропиткой растворителем (контроль)

Мы наблюдали значительную антибактериальную активность «вторичных» пленок БЦ с 2-амино-6-нитробензотиазолом, где площадь подавления роста

Escherichia coli на третьи сутки культивирования составила $4,43 \pm 0,67$ см². Наряду с этим в контрольных чашках отмечали практически сплошной газонный рост на самих образцах «вторичных» пленок и вокруг них.

При изучении деградации пленок и гелей бактериальной целлюлозы смешанной культурой агаролитических бактерий установлено, что данные бактерии способны использовать целлюлозу, продуцируемую *Glucanacetobacter sucrofermentans* в качестве единственного источника питания. При очистке и идентификации данной культуры обнаружены представители двух родов целлюлозоокисляющих бактерий *Cellvibrio* и *Cytophaga*. Идентификация рода *Cellvibrio* была проведена на основе исследования последовательности нуклеотидов гена 16S РНК. Выделенный нами штамм на 99% сходен с двумя видами *C. vulgaris* и *C. fulvus*. Род *Cytophaga* проявлялся наличием характерных для этого рода округлых микроспор.

Наиболее высокая степень деградации характерна для гелей бактериальной целлюлозы, наличие воды и рыхлое расположение волокон, безусловно, способствует высокой степени адсорбции клеток бактерий на образцах геля (табл. 3).

Таблица 3

Скорость деградации различных образцов целлюлозы, мг/сутки

Фильтровальная бумага	Калька	Гель БЦ	Пленка БЦ, 95,3 нм	Пленка БЦ, 407,2 нм
0,774±0,018	1,400±0,23	18,02±1,86	0,750±0,015*	0,300±0,017* ^Δ

Примечание: * $p < 0,01$ по отношению к кальке; ^Δ $p < 0,01$ по отношению к более тонкой пленке

Скорость утилизации образцов пленок бактериальной целлюлозы зависела от толщины и плотности. Деградация более тонких пленок идет быстрее в два раза (см. табл. 3). Наиболее быстро происходит деградация кальки, скорость утилизации тонкой пленки сопоставима со скоростью использования фильтровальной бумаги и на 46% меньше, чем деградация сопоставимой по толщине кальки. Медленнее деградирует плотная, более толстая пленка бактериальной целлюлозы (см. табл. 3).

Заключение

Культивирование *Gluconacetobacter sucrofermentans* позволяет получить гели и гель-пленки бактериальной целлюлозы различной толщины и плотности, варьируя условия выращивания бактерий. Пленки имеют нановолокнистую структуру, гели обладают высокой влагоудерживающей способностью. Использование пленок БЦ в качестве носителей антибиотических соединений показало их высокую эффективность. Целлюлозоразрушающие бактерии смешанной культуры, содержащей представителей родов *Cellvibrio* и *Cytophaga*, способны утилизировать бактериальную целлюлозу как единственный источник углерода. Скорость деградации геля высокая, утилизация пленки зависит от толщины и плотности пленок. Тонкие пленки деградируют со скоростью, сопоставимой с фильтровальной бумагой.

Литература

1. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А. Получение бактериальной целлюлозы и нанокпозиционных материалов. — Саранск: Изд-во Мордовского университета, 2014. — 128 с.
2. Романов Д.П., Баклагина Ю.Г., Губанова Г.Н., Уголков В.Л. Формирование органо-неорганических композитных материалов медицинского назначения на основе целлюлозы *Acetobacter xylinum* и фосфатов кальция // Физика и химия стекла. — 2010. — С. 895–879.
3. Grande Cr.J., Torres F.G., Gomez C.M., Vano M.C. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications // Acta Biomaterialia. — 2009. — Vol. 5. — P. 1605–1615.
4. Matthias U. Polysaccharides: current innovations and future trends. — Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. — 358 p.

THE PREPARATION, PROPERTIES, USE AND RATE OF DEGRADATION OF THE FILMS AND GELS OF BACTERIAL CELLULOSE PRODUCED BY *GLUCONACETOBACTER SUCROFERMENTANS*

N.A. KLENOVA, T.A. OVCHINNIKOVA, U.A. MARKOVA,
V.S. SOBOLEVA, E.U. SOSOVA, A.E. EROFEEVA

Samara National Research University

The article provides information about the methods of obtaining the bacterial cellulose in the form of gels, gel films and «secondary» films in different culture conditions of *Gluconacetobacter sucrofermentans* and describes some of their properties. The using of these materials as carriers for antibiotic compounds has revealed high efficiency of the «secondary» films, when they are obtained from gels that are able to adsorb and then to give antibacterial and antifungal substances. The authors study the rate of the samples degradation of bacterial cellulose by a mixed culture of agarolytics in a comparative perspective and show its comparability with the degradation of the plant cellulose samples.

Keywords: bacterial cellulose, gels, films, degradation.

РЕКУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПОСЛЕ ДОЛГОВРЕМЕННОГО ХРАНЕНИЯ КОЛЛЕКЦИИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *SPIRULINA (ARTHROSPIRA)* С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕГЕНЕРИРОВАННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Д.И. ПЕТРУХИНА*

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского

Представленная работа посвящена изучению возможности культивирования на регенерированной питательной среде Заррука коллекции цианобактерий рода *Spirulina (Arthrospira)* (7 штаммов) после 6-месячной криоконсервации при температуре -80°C . Питательную среду Заррука получали после культивирования на ней цианобактерий *Spirulina (Arthrospira)*. Биомасса цианобактерий *Spirulina (Arthrospira)* была криоконсервирована, тогда как отделенная от нее питательная среда Заррука прошла физико-химическую обработку с применением солей трехвалентного железа и активированного угля. В работе получены данные о влиянии регенерированной питательной среды Заррука на скорость роста цианобактерий *Spirulina (Arthrospira)* после криоконсервации. Рост этих цианобактерий после оттаивания был удовлетворительным и имел такой же порядок величины, что и рост этих цианобактерий на новой (свежей) питательной среде Заррука. Результаты показывают, что повторное использование регенерированной питательной среды Заррука может быть осуществлено для рекультивации коллекции цианобактерий рода *Spirulina (Arthrospira)* после долговременной криоконсервации.

Ключевые слова: регенерация питательной среды, рециклинг, цианобактерии, *Spirulina (Arthrospira)* sp., криоконсервирование, низкотемпературное хранение.

Введение

В научной литературе накоплен значительный фактический материал относительно методов культивирования цианобактерий, из которого следует, что разработанная Зарруком питательная среда для цианобактерии *Arthrospira platensis* стала стандартной средой для выращивания цианобактерий рода *Arthrospira* и *Spirulina*. Вместе с тем остаются неясными перспективы возможного повторного использования питательной среды Заррука после выращивания на ней культур *Arthrospira* и *Spirulina*. В ходе собственных экспериментов стало ясно, что после отделения биомассы цианобактерий *Arthrospira* и *Spirulina*, которую мы подвергали затем низкотемпературному хранению при -80°C [1, 2, 8, 9], питательная среда Заррука имеет высокую мутность, что обусловлено присутствием взвешенных органических веществ, а также окрашена пигментами, высвобожденными из

разрушенных клеток цианобактерий. Однако основные питательные соединения, такие как нитраты, фосфаты и карбонаты, присутствуют в питательной среде Заррука, что позволяет провести лишь частичное их восполнение для повторного использования.

В настоящей работе была осуществлена очистка питательной среды Заррука от продуктов жизнедеятельности цианобактерий *Arthrospira* и *Spirulina*, эффективность которой была быстро оценена с использованием спектрофотометра как в отношении растворенных пигментов [6], так и органических соединений [4, 5, 7, 10]. На регенерированной питательной среде Заррука было проведено выращивание оттаявшей биомассы коллекции штаммов цианобактерий *Arthrospira* и *Spirulina* после хранения в течение шести месяцев при -80°C .

Материалы и методы

Процедуре очистки от органических примесей подвергали питательную среду Заррука, полученную после отделения выросшей на ней биомассы цианобактерий. В качестве объектов исследований нами была выбрана коллекция из 7 штаммов, а именно: цианобактерии *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis* и *Spirulina laxissima* из коллекции культур университета Пастера, Франция (РСС) и коллекции водорослей университета

© 2018 г. Петрухина Д.И.

* Автор для переписки:

Петрухина Дарья Игоревна

лаборант кафедры ботаники, микробиологии и экологии Института естествознания ФГБОУ ВО «Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского»

248003 Калуга, ул. Ст. Разина, 26.

E-mail: daria.petrukhina@outlook.com

Геттингена, Германия (SAG). Все культуры штаммов из коллекции культур университета Пастера были аксеничными, тогда как культуры всех штаммов из коллекции водорослей университета Геттингена не были аксеничными и содержали сопутствующие бактерии из среды, из которой был изолирован штамм цианобактерии.

Порошок активированного угля в концентрациях 20, 30 и 40 мг/л (рис. 1) в сочетании либо с хлоридом, либо сульфатом железа(III) одновременно добавляли к питательной среде Заррука и перемешивали в течение 45 минут со скоростью 110 оборотов в минуту. По истечении этого времени прекращали перемешивание и среду отстаивали в течение 50 минут для осаждения образовавшихся хлопьев. Далее проводили фильтрование среды на вакуумной установке через фильтр из ацетата целлюлозы с диаметром пор 3 мкм, а затем через 0,45 мкм — для стерилизации.

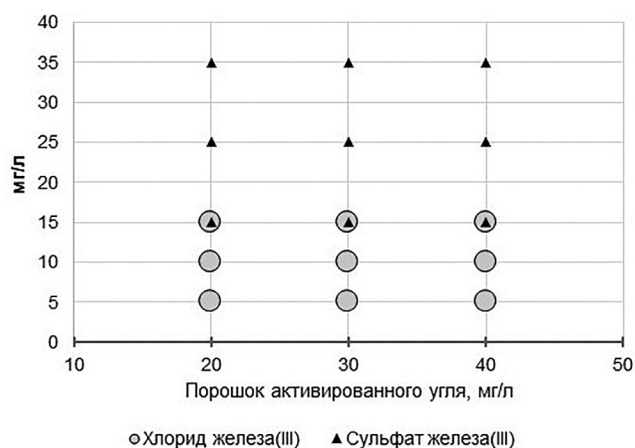


Рис. 1. Экспериментальная обработка для очистки среды Заррука

До и после процедуры очистки питательной среды Заррука от органических примесей измеряли концентрацию в ней нитратов, карбонатов, фосфатов по стандартным методикам. Полноту удаления органических веществ и растворенных пигментов определяли спектрометрическим методом при длине волны 254 нм и при длине волны 440 нм соответственно. Расчет полноты удаления (R , %) растворенных органических веществ и пигментов из питательной среды Заррука проводили по формуле: $R = (Et_0 - Et_x) / Et_0 \times 100\%$, где Et_0 и Et_x — соответствующие значения оптической плотности в среде до (t_0) и после (t_x) очистки.

Отделенную биомассу коллекции штаммов цианобактерий криоконсервировали по методике, которая была описана нами ранее [2], хранили в течение шести месяцев при -80°C , а после оттаивания выращивали с

ранее опубликованными параметрами культивирования [1, 2] на свежеприготовленной либо регенерированной среде Заррука, которую после фильтрования помещали в колбы Эрленмейера и прибавляли нитрат натрия в качестве источника азота до концентрации 2,5 г/л. Во время культивирования оценивали ростовые характеристики штаммов *Arthrospira* и *Spirulina* в зависимости от используемой для роста питательной среды Заррука.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты приведены на рисунках 2 и 3. На рисунке 3 контрольная проба показывает характеристики полученной питательной среды Заррука после отделения от цианобактериальной биомассы, а остальные пробы демонстрируют характеристики питательной среды после различных вариантов очистки. Контрольная проба имела значение рН в 10,6 (см. рис. 2), а питательные минеральные вещества были потреблены из нее неполностью (см. рис. 3). После проведенных процедур по очистке во всех тестовых пробах регенерированной питательной среды Заррука среднее значение рН снижалось до 9,8–9,9 (см. рис. 2). Также после проведения очистки питательной среды Заррука наблюдали снижение концентрации нитратов по отношению к контрольной пробе, которое росло с увеличением концентрации активированного угля, независимо от концентрации солей железа. Однако концентрация нитратов в пробах, обрабатываемых сульфатом железа и активированным углем, снижалась сильнее, чем при использовании хлорида железа. Снижение концентрации карбонатов тоже росло с увеличением концентрации активированного угля при различных концентрациях солей железа. А снижение концентрации фосфатов в очищенной питательной среде Заррука по отношению к контрольной пробе росло с увеличением концентрации солей железа, независимо от концентрации активированного угля (см. рис. 3). Лучший результат полноты удаления растворенных органических веществ и пигментов наблюдали при использовании хлорида железа (см. рис. 2). Наилучший вариант очистки питательной среды, после которого наблюдали минимальное снижение концентраций нитратов, карбонатов и фосфатов и наилучшее удаление растворенного органического вещества и пигментов, был достигнут благодаря применению порошка активированного угля в 40 мг/л и хлорида трехвалентного железа в концентрации 10 мг/л. Поэтому после проведения регенерации питательной среды Заррука наилучшим вариантом ее использовали для рекультивирования коллекции штаммов циано-

бактерий с целью проверки влияние регенерированной питательной среды на рост биомассы после оттаивания (табл. 1). Регенерированная среда была дополнена ни-

тратом натрия (2,5 г/л) в качестве источника азота. Для контрольной пробы использовали свежую питательную среду Заррука.

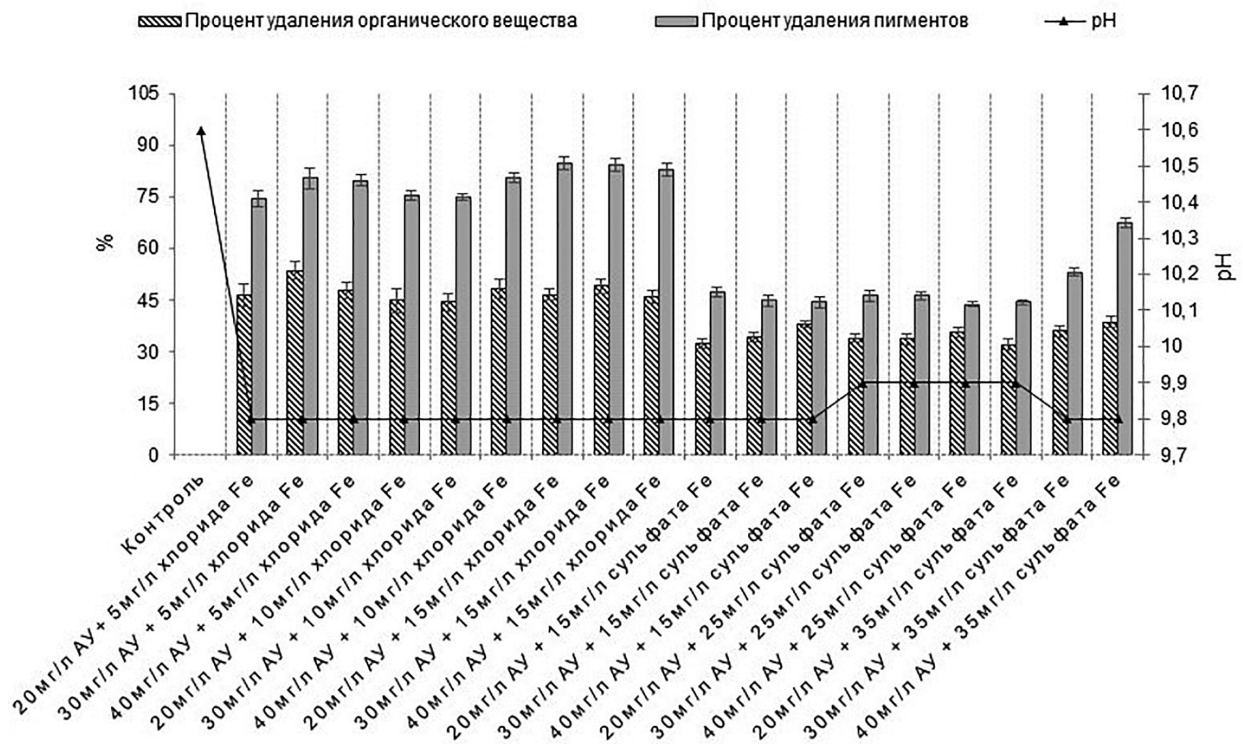


Рис. 2. Результаты очистки питательной среды

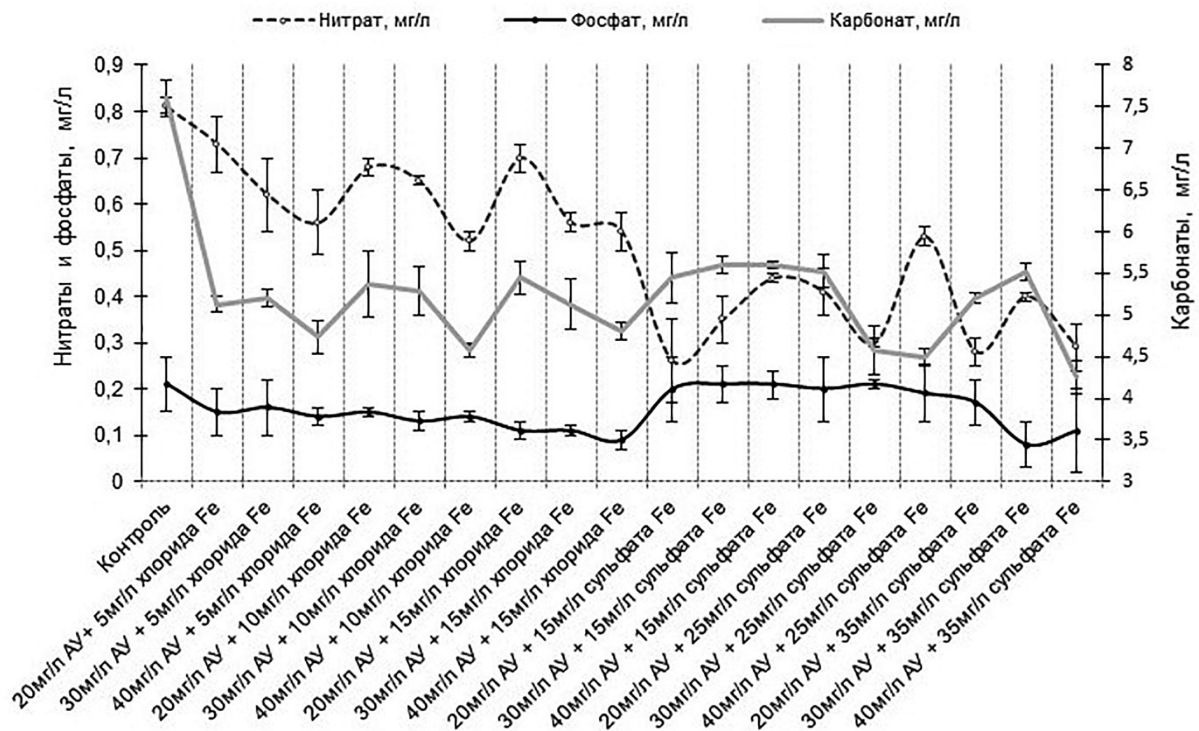


Рис. 3. Остаточные концентрации соединений после очистки

Для быстрого определения прироста биомассы *Spirulina (Arthrospira)* после оттаивания были созданы калибровочные кривые зависимости количества сухой биомассы от оптической плотности суспензии на длине волны в 750 нм для каждого штамма. Так, для *Arthrospira platensis* PCC 9108, SAG 21.99 и SAG 257.80 коэффициенты корреляции описаны нами ранее [3], они составили 0,83 г/л для *Arthrospira platensis* PCC 9108 ($y=0,8271x$, $R^2=0,9637$), 0,91 г/л для *Arthrospira platensis* SAG 257.80 ($y=0,9098x$, $R^2=0,9887$) и 0,88 г/л для *Arthrospira platensis* SAG 21.99 ($y=0,8778x$, $R^2=0,9816$). А для остальных, исследуемых в данной работе штаммов, они составили: 0,78 г/л для *Arthrospira maxima* SAG 49.88 ($y=0,7826x$, $R^2=0,9314$), 0,94 г/л для *Arthrospira maxima* SAG 84.79 ($y=0,9388x$, $R^2=0,9814$), 0,45 г/л для *Spirulina laxissima* SAG

256.80 ($y=0,4462x$, $R^2=0,9549$) и 0,77 г/л для *Arthrospira platensis* PCC 7345 ($y=0,7729x$, $R^2=0,9879$). Коэффициенты корреляции, полученные для исследуемых в нашей работе штаммов цианобактерий, подтверждают видоспецифичность данного параметра и необходимость определения для каждого конкретного объекта исследования.

В таблице 1 представлены результаты роста семи штаммов *Spirulina (Arthrospira)* после оттаивания. Приведенные результаты позволяют сделать вывод о том, что достоверного отличия в ростовых характеристиках у рекультивируемых цианобактерий, выращенных после оттаивания на регенерированной питательной среде Заррука по сравнению с цианобактериями, выращенными после оттаивания на новой (свежей) питательной среде Заррука, зафиксировано не было.

Таблица 1

Ростовые характеристики штаммов *Spirulina* и *Arthrospira* после оттаивания

Штамм	Вариант питательной среды	Максимальная скорость роста (час ⁻¹)	День, на который достигается максимальная скорость роста	Средняя продуктивность (г/л·час)
SAG 49.88	регенерированная	0,018±0,0018	4±0,05	0,0259±0,0018
	новая	0,020±0,0010	4±0,04	0,0256±0,0020
SAG 84.79	регенерированная	0,020±0,0030	2±0,03	0,00380±0,0020
	новая	0,019±0,0010	2±0,05	0,00378±0,0010
PCC 9108	регенерированная	0,010±0,0017	2±0,02	0,00342±0,0011
	новая	0,011±0,0018	2±0,04	0,00341±0,0013
SAG 256.80	регенерированная	0,027±0,0020	6±0,05	0,00259±0,0012
	новая	0,029±0,0020	6±0,04	0,00257±0,0020
SAG 257.80	регенерированная	0,011±0,0011	2±0,05	0,00441±0,0018
	новая	0,011±0,0017	2±0,05	0,00436±0,0017
PCC 7345	регенерированная	0,019±0,0018	4±0,03	0,00261±0,0015
	новая	0,018±0,0013	4±0,03	0,00260±0,0015
SAG 21.99	регенерированная	0,010±0,0011	2±0,03	0,00260±0,0016
	новая	0,009±0,0010	2±0,03	0,00257±0,0016

Уже после повторного использования для выращивания цианобактериальной биомассы в питательной среде Заррука определяли содержание нитратов, фосфатов и карбонатов для того, чтобы убедиться в потреблении этих питательных веществ цианобактериями. Результаты показали, что концентрация нитратов снижается после культивирования до 0,52±0,03 мг/л, а поскольку азот в виде нитрата натрия был добавлен после проведения очистки в регенерированную среду Заррука, данное снижение вызвано ростом клеток цианобактерий. Концентрация фосфатов также снижалась до 0,14±0,01 мг/л после повторного использования для рекультивирования цианобактерий. Величина снижения концентрации фосфатов указывает на их большое потребление цианобактериями во время рекультивации и на то, что, скорее всего, будет необходимо добавление фосфатов в среду Заррука после

следующей очистки. Концентрация карбонатов также значительно снизилась до 4,58±0,1 мг/л, и для нового повторного использования питательной среды Заррука нужно будет восстановить концентрацию карбонатов до стандартного значения. Культивирование цианобактерий после оттаивания начиналось при значениях рН в 9,8, которое в процессе роста культур повышалось до 10,4–10,7.

Заключение

Результаты представленной работы показывают, что повторное использование жидкой питательной среды Заррука после ее регенерации физико-химическими методами, а именно: после обработки порошком активированного угля с хлоридом железа с обогащением нитратом натрия в качестве источника азота, может быть применимо

для рекультивации коллекции цианобактерий рода *Spirulina* (*Arthrospira*) после долговременной криоконсервации. Семь штаммов цианобактерий рода *Spirulina* (*Arthrospira*): *Arthrospira platensis* PCC 9108, *Arthrospira platensis* SAG 257.80, *Arthrospira platensis* SAG 21.99, *Arthrospira platensis* PCC 7345, *Arthrospira maxima* SAG 49.88, *Arthrospira maxima* SAG 84.79, *Spirulina laxissima* SAG 256.80 были успешно рекультивированы после шести месяцев хранения при -80°C в присутствии 10%-ного раствора диметилсульфоксида на регенерированной питательной среде Заррука, а их ростовые характеристики не отличались от таковых у контрольных культур, рекультивированных на свежей (новой) питательной среде Заррука.

Литература

1. Петрухина Д.И., Лыков И.Н. Исследование эффективности сохранения цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после криоконсервации диметилсульфоксидом при -80°C // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2015. — Т. 11. — № 4. — С. 26–31.
2. Петрухина Д.И., Лыков И.Н. Исследование эффективности сохранения цианобактерии *Spirulina subsalsa* после криоконсервации при -80°C в присутствии глюкозы // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. — 2016. — Т. 6. — № 4. — С. 68–73.
3. Петрухина Д.И., Лыков И.Н. Низкотемпературное хранение цианобактерии *Arthrospira platensis* // Технологии живых систем. — 2017 (принята к печати).
4. Croue J.P., Debroux J.F., Amy G.L., Aiken G.R., Leenheer J.A. Natural organic matter: structural characteristics and reactive properties // In: Singer P.C. (ed.) Formation and Control of Disinfection By-Products in Drinking Water. American Water Works Association: Denver, CO. — 1999. — P. 65–93.
5. Edzwald J.K., Beker W.C., Wattier L. Surrogate parameters for monitoring organic matter and THM precursors // Journal of the American Water Works Association. — 1985. — Vol. 77. — P. 122–131.
6. Ferrari G.M., Tassan P. A method using chemical oxidation to remove light absorption by phytoplankton pigments // Journal of Phycology. — 1999. — Vol. 35. — P. 1090–1089.
7. Kabsch-Korbutowicz M. Effect of Al coagulant type on natural organic matter removal efficiency in coagulation/ultrafiltration process // Desalination. — 2005. — Vol. 185(1–3). — P. 327–333.
8. Petrukhina D.I., Lykov I.N. Freezing and storage of the cyanobacterium *Spirulina subsalsa* at low temperature (-80°C). Science, Technology and Higher Education: materials of the XI International research and practice conference. October 19–20, Westwood, Canada. — 2016. — 2016. — P. 128–131.
9. Petrukhina D.I., Lykov I.N. Estimation of restored culture of cyanobacteria *Arthrospira platensis* growth rates after long-term cryopreservation // European Science and Technology: 18th International scientific conference. Oktober 04–05, Munich, Germany. — 2017. — P. 6–9.
10. Weishaar J.L., Aiken G.R., Bergamaschi B.A., Fram M.S., Fujii R., Mopper K. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon // Environmental Science and Technology. — 2003. — Vol. 37. — P. 4702–4708.

RECOLTIVATION AFTER LONG-TERM STORAGE OF CYANOBACTERIA *SPIRULINA* (*ARTHROSPIRA*) COLLECTION WITH REUSING A REGENERATED MEDIUM

D.I. PETRUKHINA

Tsiolkovsky Kaluga State University, Russia

The presented work is devoted to the study of the possibility of cultivation of a collection of cyanobacteria of the genus *Spirulina* (*Arthrospira*) (7 strains) after a 6-month cryopreservation at a temperature of -80°C on the regenerated nutrient medium of Zarrouk. Nutritional medium of Zarrouk was obtained after cultivation on it of cyanobacteria *Spirulina* (*Arthrospira*). The biomass of cyanobacteria *Spirulina* (*Arthrospira*) was cryopreserved, while the Zarrouk nutrient medium separated from it underwent physico-chemical treatment with the use of salts of ferric iron and activated carbon. The data on the effect of the regenerated nutrient medium of Zarrouk on the growth rate of cyanobacteria *Spirulina* (*Arthrospira*) after cryopreservation were obtained. The growth of these cyanobacteria after thawing was satisfactory and was of the same order of magnitude as the growth of these cyanobacteria in the new (fresh) nutrient medium of Zarrouk. The results show that the reuse of the regenerated nutrient medium of Zarrouk can be carried out to recultivate the collection of cyanobacteria of the genus *Spirulina* (*Arthrospira*) after long-term cryopreservation.

Keywords: regeneration of the nutrient medium, recycling, cyanobacteria, *Spirulina* (*Arthrospira*) sp., cryopreservation, low-temperature storage.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ *VIBRIO SP.* К МОДЕЛЬНЫМ ТОКСИКАНТАМ С ЦЕЛЬЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОСЕНСОРОВ

М.В. ЖУРАВЛЕВА, Ш.К. КАРЧАВА, И.С. САЗЫКИН, Е.М. КУДЕЕВСКАЯ,
М.И. ХАММАМИ, Н.В. ГНЕННАЯ, М.А. САЗЫКИНА*

*Южный федеральный университет,
Академия биологии и биотехнологии имени Д.И. Ивановского, Ростов-н-Д*

В работе представлены результаты исследования чувствительности природных биолюминесцентных бактерий *Vibrio sp.*, выделенных из воды Черного моря. Определена чувствительность микроорганизмов к следующим модельным токсикантам: сульфат меди, сульфат цинка, бихромат калия, додецилсульфат натрия, фенол. В результате исследования выделен наиболее чувствительный штамм светящихся бактерий, который может быть использован в тестировании токсичности природных объектов.

Ключевые слова: люминесцентные бактерии, загрязнение, токсичность, биотестирование.

Введение

В настоящее время в условиях роста техногенной нагрузки на окружающую среду все более актуальными становятся вопросы оценки ее экологического состояния. Экологические токсиканты представляют значительный риск для окружающей среды и здоровья человека. Ежегодно в мире производится более 50000 тонн фенолов и пентахлорфенолов, 40000 тонн монохлорфенолов, более 2 млн. тонн сульфонатов. Соответственно, высок и уровень загрязнения окружающей среды в процессе их производства (Malaj et al., 2014 [22]; Brack, 2016 [14]).

Один из современных методов экологического контроля за содержанием в объектах окружающей среды токсических веществ, которые представляют угрозу для живых организмов, — биотестирование. Главные его достоинства — простота и доступность приемов их постановки, высокая чувствительность тест-организмов к минимальным концентрациям токсических агентов, экологическая информативность (Цыбульский, Сазы-

кина, 2010 [11]; Бакаева, 2011 [1]; Постнов, 2012 [6]). Биотестирование можно применять для оценки степени токсичности сточных вод на очистных сооружениях; при проведении экологической экспертизы технологий очистки, новых материалов, фармпрепаратов, пищевой продукции и др. В связи с этим методы биотестирования приобретают все большую популярность и внедряются повсеместно.

В настоящее время в экологическом мониторинге используются биотесты на токсичность с использованием различных организмов (Kahru et al., 2005) [20], включая клеточные линии (Dragone et al., 2009) [17], животных (Sims et al., 2009 [27]; Hermi et al., 2009 [19]), микроорганизмы (Sousa et al., 2009 [28]; Riedel et al., 2002 [25]). Наиболее перспективен анализ с использованием биосенсоров (Daniel et al., 2008 [16]; Palchetti et al., 2008 [24]), в том числе на основе светящихся бактерий (Woutersen et al., 2011; Elad, Belkin, 2013 [18]; Xu et al., 2013 [29]; Zhang et al., 2013 [31]; Ma et al., 2014 [23]; Сазыкина и др., 2013–2016 [7–10]; Sazykin et al., 2016 [26]).

Важный аспект, который необходимо принимать во внимание при использовании биотестирования интегральной токсичности на основе люминесцентных штаммов, — их чувствительность к токсическим веществам. Следует отметить огромное разнообразие люминесцентных биотестов, в том числе для определения интегральной токсичности (например, «Microtox» (США), «ToxAlert» (Германия), «LUMiStox» (Великобритания), «TOXcontrol» (Нидерланды) и др.). Наибольшее распространение в

© 2018 г. М.В. Журавлева, Ш.К. Карчава, И.С. Сазыкин, Е.М. Кудеевская, М.И. Хаммами, Н.В. Гненная, М.А. Сазыкина

* **Автор для переписки:**

Сазыкина Марина Александровна

д.б.н., доцент, зав. лабораторией экологии и молекулярной биологии микроорганизмов, ведущий научный сотрудник, Южный федеральный университет

344090 Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/2

E-mail: samara@sfedu.ru

странах Европы и США получил тест «Microtox» (Дерябин, 2009) [2]. К недостатку этих методов следует отнести недостаточно высокую чувствительность. В связи с этим необходим поиск люминесцентных микроорганизмов, высокочувствительных к поллютантам, для создания на их основе новых тест-систем.

Учитывая вышесказанное, целью нашей работы стал поиск штаммов светящихся бактерий, обладающих высокой степенью чувствительности к токсичным веществам. Создание тест-системы на основе таких штаммов люминесцентных бактерий позволит в дальнейшем получить высокочувствительный метод оценки токсичности компонентов экосистем.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

В работе использованы 5 штаммов люминесцентных бактерий *Vibrio* sp. EMBM 01-05, выделенных из воды Черного моря.

Питательные среды и условия роста

Для культивирования люминесцентных бактерий использовалась питательная среда LB (Maniatis, 1982) с добавлением NaCl (3,0%).

Химические вещества

Для проведения экспериментов использовались следующие химические вещества: $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $K_2Cr_2O_7$, додецилсульфат натрия (SDS) и фенол («Акватест»).

Измерение биолюминесцентного ответа суспензии светящихся бактерий в присутствии растворов токсикантов

Культуры люминесцентных бактерий выращивали на среде LB с добавлением 3% NaCl в течение ночи. Ночную культуру разводили при помощи денситометра DEN-1 («BioSan») в физиологическом растворе до мутности 1 ед. Мак-Фарланда.

Далее аликвоты суспензии биолюминесцентных бактерий по 180 мкл переносили в лунки микропланшетов, часть из них служила контролем (в них добавляли 20 мкл дистиллированной воды). В другие лунки вносили по 20 мкл раствора-токсиканта. Измерение люминесценции проводилось на микропланшетном люминометре «Luminoskan ascent Thermo scientific» (Thermo Electron Corporation). Измерение проводилось в течение 30 минут с интервалом между измерениями 5 мин.

Определение индекса токсичности

Критерием токсического действия служило изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в

исследуемой пробе по сравнению с таковой для пробы с раствором, не содержащим токсических веществ. Острое токсическое действие исследуемого токсиканта на бактерии определяли по ингибированию их биолюминесценции за 30-минутный период экспозиции. Количественная оценка реакции на токсичность выражалась в виде безразмерной величины — индекса токсичности «Т», рассчитываемого по формуле $T=100(I_k-I_0)/I_k$, где I_0 и I_k , соответственно, интенсивность свечения бактерий в опытной и контрольной пробах при фиксированном времени экспозиции исследуемого раствора с тест-объектом (MP 01.021-07).

В ряде случаев возможен вариант, когда интенсивность биолюминесценции в анализируемой пробе больше, чем в контроле. В таком случае независимо от величины отрицательного значения «Т» делался вывод об отсутствии токсичности образца, и индекс токсичности принимает нулевое значение.

Для сравнительной оценки чувствительности к стандартным токсикантам природных биолюминесцентных штаммов, выделенных из морской воды, использовали характеристику EC_{50} (effective concentration) — концентрацию вещества, вызывающую 50% снижение биолюминесценции бактериальной суспензии в течение 30 мин.

Чувствительность всех выделенных штаммов светящихся бактерий была протестирована в определенных диапазонах концентраций исследуемых токсикантов. Полученные данные позволили определить величину EC_{50} и сравнить по этому показателю чувствительность светящихся бактерий, применяемых в различных биотестах.

В качестве токсических веществ в работе использовали: сульфат меди ($CuSO_4 \times 5H_2O$), сульфат цинка ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$), додецилсульфат натрия ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$) и фенол (C_6H_5OH).

Результаты и обсуждение

На рисунках 1–5 представлены результаты определения эффективной концентрации EC_{50} для исследованных штаммов *Vibrio* sp. EMBM 01-05 в присутствии модельных токсикантов ($ZnSO_4$, $CuSO_4$, $K_2Cr_2O_7$, SDS и фенол).

Как видно из данных, представленных на рисунке 1, в отношении $ZnSO_4$ для штаммов *Vibrio* sp. EMBM 01 и 03 была зарегистрирована величина EC_{50} , равная 0,25 и 0,5 мг/л (содержание цинка 0,06 и 0,11

мг/л, соответственно). Минимальная EC_{50} была зарегистрирована для штаммов 04 и 05 и составила 0,1 мг/л (в пересчете на содержание цинка 0,02 мг/л). Штамм *Vibrio* sp. ЕМВМ-02 проявил наименьшую чувствительность к сульфату цинка — величина EC_{50} равнялась 10 мг/л (содержание цинка — 2,26 мг/л) (рис. 1).

Максимальную чувствительность к $CuSO_4 \times 5H_2O$ проявили штаммы 03 и 04, величина EC_{50} составила 0,5 и 0,1 мг/л (содержание меди 0,13 мг/л и 0,03 мг/л соответственно) (рис. 2). Для штамма *Vibrio* sp. ЕМВМ 01 чувствительность была самой низкой и составила 100 мг/л $CuSO_4$ (содержание меди — 25,6 мг/л).

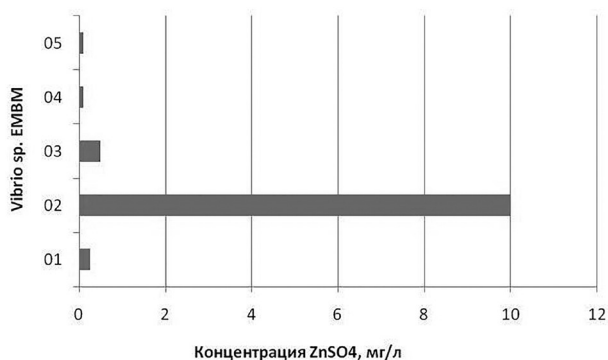


Рис. 1. Чувствительность штаммов *Vibrio* sp. ЕМВМ 01-05 к действию $ZnSO_4 \times 7H_2O$ (EC_{50} , мг/л)

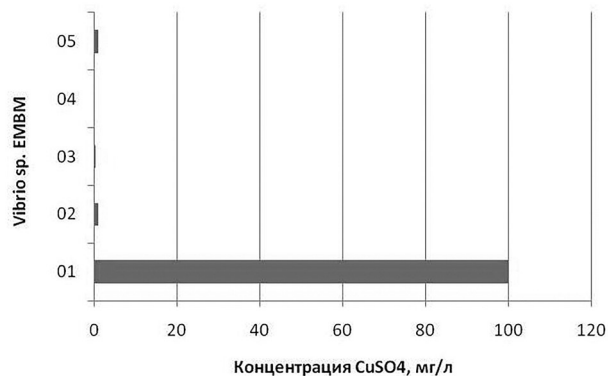


Рис. 2. Чувствительность штаммов *Vibrio* sp. ЕМВМ 01-05 к действию $CuSO_4 \times 5H_2O$ (EC_{50} , мг/л)

Наибольшую чувствительность к действию SDS проявил штамм *Vibrio* sp. ЕМВМ 03 — величина EC_{50} составила 1 мг/л (рис. 3). Для штаммов *Vibrio* sp. ЕМВМ 02 и 04 EC_{50} была значительно выше (5 и 10 мг/л, соответственно). Штаммы *Vibrio* sp. ЕМВМ 01 и 05 оказались наименее чувствительными — величина EC_{50} равнялась 50 мг/л.

Чувствительность штаммов *Vibrio* sp. ЕМВМ 01-05 к действию $K_2Cr_2O_7$ представлена на рисунке 4.

Для четырех штаммов *Vibrio* sp. ЕМВМ 02-05 значения EC_{50} для $K_2Cr_2O_7$ составили 25 мг/л, а для *Vibrio* sp. ЕМВМ 01 — 50 мг/л.

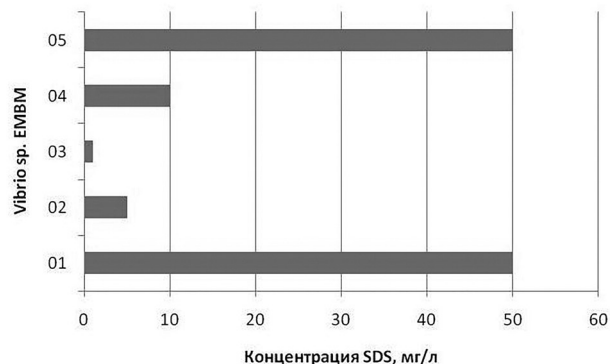


Рис. 3. Чувствительность штаммов *Vibrio* sp. ЕМВМ 01-05 к действию SDS (EC_{50} , мг/л)

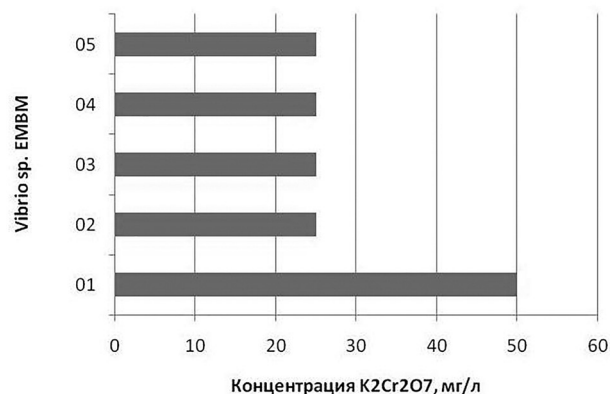


Рис. 4. Чувствительность штаммов *Vibrio* sp. ЕМВМ 01-05 к действию $K_2Cr_2O_7$, (EC_{50} , мг/л)

Минимальная величина EC_{50} для фенола — 150 мг/л — была зарегистрирована для штамма *Vibrio* sp. ЕМВМ 02 (рис. 5). Наименьшую чувствительность показал штамм *Vibrio* sp. ЕМВМ 01 — величина EC_{50} составила 450 мг/л.

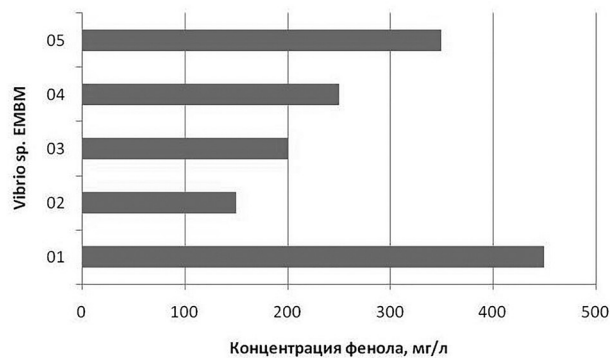


Рис. 5. Чувствительность штаммов *Vibrio* sp. ЕМВМ 01-05 к действию фенола (EC_{50} , мг/л)

В таблице 1 представлены сравнительные данные по чувствительности всех исследованных люминесцентных штаммов *Vibrio sp.* ЕМВМ 01-05.

Из данных, приведенных на рисунках 1–5 и в таблице 1, видно, что максимальный уровень чувствительности к исследованным токсическим веществам выявлен у штамма *Vibrio sp.* ЕМВМ 04. Для него зарегистрированы наименьшие величины EC_{50} для трех исследованных модельных токсикантов.

Представляло интерес сравнить эффективность этого штамма с показателями других люминесцентных

бактерий, которые используются в мировой практике при тестировании токсичности. Анализ чувствительности бактерии *Janthinobacterium lividum* УН9-РС, которая была выделена из подземных вод, трансформирована генами luxAB и оптимизирована для тестирования токсичности, показал, что EC_{50} для меди у этого штамма составила 10,5 мг/л, а для цинка — 1,3 мг/л. Эти значения EC_{50} говорят о том, что чувствительность *Vibrio sp.* ЕМВМ 04 лучше в 350 и 65 раз, соответственно. Тем не менее следует указать, что для *J. lividum* УН9-РС зарегистрирована меньшая EC_{50} для фенола — 13 мг/л (Cho et al., 2004) [15].

Таблица 1

Чувствительность штаммов светящихся бактерий *Vibrio* ЕМВМ 01-05 к действию различных токсических веществ, EC_{50} , мг/л

Штамм	EC_{50} , мг/л				
	ZnSO ₄ ×7H ₂ O*	CuSO ₄ ×5H ₂ O**	K ₂ Cr ₂ O ₇	SDS	Фенол
<i>Vibrio sp.</i> ЕМВМ 01	0,06	25,6	50	50	450
<i>Vibrio sp.</i> ЕМВМ 02	2,26	0,26	25	5	150
<i>Vibrio sp.</i> ЕМВМ 03	0,11	0,13	25	1	200
<i>Vibrio sp.</i> ЕМВМ 04	0,02	0,03	25	10	250
<i>Vibrio sp.</i> ЕМВМ 05	0,02	0,26	25	50	350

Примечание: * — в пересчете на содержание Zn; ** — в пересчете на содержание Cu

Штамм *Acinetobacter sp.* DF4 (DF4/PUTK2) был выделен Abd-El-Haleem et al. (2006) [12] из промышленных сточных вод и трансформирован репортерными lux-генами. Согласно исследованиям авторов, EC_{50} для меди составила 5 мг/л, а для фенола — 170 мг/л (Zaki et al., 2008) [30]. То есть по отношению к меди чувствительность нашего штамма *Vibrio sp.* ЕМВМ 04 выше более чем в 160 раз, но по сравнению с фенолом в 1,5 раза меньше, чем у *Acinetobacter sp.* DF4 (DF4/PUTK2).

По сравнению с чувствительностью штаммов *V. fischeri* ВКПМ В-9579 и *V. fischeri* ВКПМ В-9580, предлагаемых для тестирования токсичности водных экосистем (Цыбульский, Сазыкина, 2010) [11], для *Vibrio sp.* ЕМВМ 04 также выявлены лучшие показатели чувствительности к исследованным токсическим веществам. Величина EC_{50} была меньше для ZnSO₄×7H₂O — в 20 и 40 раз; для CuSO₄×5H₂O — в 10 и 20 раз; для K₂Cr₂O₇ была примерно на одинаковом уровне; для SDS — в 15 и 20 раз меньше (для *V. fischeri* ВКПМ В-9579 и *V. fischeri* ВКПМ В-95800, соответственно).

О преимуществе использования в экологическом контроле *Vibrio sp.* ЕМВМ 04 свидетельствует и сравнительный анализ со штаммами, которые лежат в основе

различных тест-систем, официально используемых для тестирования токсичности различных объектов.

Так, например, для *V. fischeri* (Microtan B.V. Waaljik N.L.), который используется в системе мониторинга токсичности «TOXcontrol», в отношении CuSO₄×5H₂O зарегистрирована EC_{50} , равная 4,68 мг/л (1,3 мг/л в пересчете на содержание меди). В сравнении с ЕМВМ 04 эта величина больше в 43 раза (Lopez-Roldan et al., 2012) [21]. При сравнении с тест-штаммом, используемым в системе «Microtox», *Vibrio sp.* ЕМВМ 04 оказался чувствительным более чем на порядок к ZnSO₄ (Blaise, 2005) [13]. Также чувствительность *Vibrio sp.* ЕМВМ 04 намного выше таковой природного штамма *Photobacterium phosphoreum* В17-677F, который используется для тестирования токсичности в Украине (КНД 211.1.4.060-97).

Заключение

В последние годы тестирование токсичности стало необходимым инструментом оценки экологических рисков. Методы химического анализа, позволяющие определить количественное содержание токсичных химических веществ, не позволяют выявить их опасность для живых

существ. Разработаны различные методы биологического тестирования, но они часто весьма дороги, требуют большого объема выборки и много времени. Из-за всех этих недостатков, ведущих к ограничению их использования, возникает необходимость в применении быстрых, воспроизводимых и экономически эффективных методов скрининга и оценки токсичности. Среди таких методов тест ингибирования люминесценции с использованием светящихся бактерий является наиболее приемлемым ввиду своей чувствительности, экономической эффективности, простоты в эксплуатации и экспрессности. Может употребляться для тестирования разнообразных объектов окружающей среды — воды, почвы, воздуха и др. Необходимое условие использования таких тестов — высокая чувствительность люминесцентных бактерий к токсическим веществам. В связи с этим требуется проведение скрининга и отбора штаммов светящихся бактерий, обладающих высокой степенью чувствительности к токсичным веществам.

Полученные нами данные свидетельствует о перспективности использования исследованных штаммов для определения токсичности объектов окружающей среды. Наибольшей чувствительностью к исследованным токсикантам обладает штамм *Vibrio* sp. ЕМВМ 04, для которого зарегистрированы меньшие EC_{50} для большей части исследованных модельных токсикантов. Анализ литературных данных показал, что *Vibrio* sp. ЕМВМ 04 также отличается высокой чувствительностью (в частности, к тяжелым металлам) по сравнению с другими штаммами люминесцентных бактерий, применяемых в различных тест-системах тестирования токсичности.

Источники финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-0078 А; при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках научного проекта № 6.2379.2017/ПЧ; гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-9072.2016.11.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Бакаева Е.Н., Игнатова Н.А. Динамика токсичности вод и донных отложений водного объекта рекреации. Современные проблемы науки и образования. — 2011. — № 6. — С. 243–243.

2. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. — М.: Наука, 2009. — 246 с.
3. Есимбекова Е.Н., Римацкая Н.В., Суковатая И.Е., Кратасюк В.А. Биолюминесцентный экспресс-метод определения интегральной токсичности воды и загрязнения воздуха // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2013. — № 10(159). — С. 122–127.
4. КНД 211.1.4.060-97. Визначення токсичності води на бактеріях *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford. — Київ, 1997. — 15с.
5. МР 01.021-07. Методика експресного визначення інтегральної хімічної токсичності питтьєвих, поверхневих, ґрунтових, стічних і очищених стічних вод з допомогою бактеріального тесту «Еколюм». Утв. 15 червня 2007 г.
6. Постнов И.Е. Физиолого-биохимический подход к биотестированию физиологически активных веществ в объектах окружающей среды // Вестник Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии. — 2012 — № 1. — С. 238–243.
7. Сазыкина М.А., Кхатаб Э.С., Кудеевская Е.М., Сазыкин И.С. Оценка качества воды родников г. Ростова-на-Дону на основе микробиологических и токсикологических показателей // Вода: химия и экология. — 2013. — № 1. — С. 102–107.
8. Сазыкина М.А., Мирина Е.А., Сазыкин И.С. Использование биосенсоров для детекции антропогенного загрязнения природных вод // Вода: Химия и экология. — 2015. — №. 10. — С. 67–79.
9. Сазыкина М.А., Сазыкин И.С., Костина Н.В., Хмелевцова Л.Е., Сазыкина М.И. Исследование экотоксикологических параметров сточных вод г. Ростова-на-Дону и г. Мюнхена // Вода: химия и экология. — 2014. — № 1. — С. 3–10.
10. Сазыкина М.А., Сазыкин И.С., Хаммаи М.И., Кудеевская Е.М., Селиверстова Е.Ю. Биосенсорный анализ антропогенного загрязнения донных отложений Нижнего Дона // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12(1). — С. 5–11.
11. Цыбульский И.Е., Сазыкина М.А. Новые биосенсоры для мониторинга токсичности среды на основе морских люминесцентных бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. — 2010. — Т. 46(5). — С. 552–557.
12. Abd-El-Haleem D., Zaki S., Abulhamd A., Elbery H., Abu-Elreesh G. Acinetobacter bioreporter assessing heavy metals toxicity // J. Basic Microbiol. — 2006. — Vol. 46(5). — P. 339–347.
13. Blaise Ch. Jean-Francois Ferard (Eds.). Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. V. 1 — Toxicity Test Methods. — Springer, 2005. — 552 p.
14. Brack W., Ait-Aissa S., Burgess R.M., Busch W., Creusot N., Di Paolo C., Escher B.I., Hewitt L.M., Hilscherova K., Hollender J., Hollert H., Jonker W., Kool J., Lamoree M., Muschket M., Neumann S., Rosikowski P., Ruttkies C., Schollee J., Schymanski E.L., Schulze T., Seiler T.B., Tindall A.J., De Aragão Umbuzeiro G., Vrana B., Krauss M. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic

- environments – An in-depth overview // *Science of the Total Environment*. – 2016. – Vol. 544. – P. 1073–1118.
15. Cho J.C., Park K.J., Ihm H.S., Park J.E., Kim S.Y., Kang I., Lee K.H., Jahng D., Lee D.H., Kim S.J. A novel continuous toxicity test system using a luminously modified freshwater bacterium // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – Vol. 20(2). – P. 338–344.
 16. Daniel R., Almog R., Ron A., Belkin S., Diamand Y.S. Modeling and measurement of a whole-cell bioluminescent biosensor based on a single photon avalanche diode // *Biosens. Bioelectron.* – 2008. – Vol. 24(4). – P. 888–893.
 17. Dragone R., Frazzoli C., Grappelli C., Campanella L. A new respirometric endpoint-based biosensor to assess the relative toxicity of chemicals on immobilized human cells // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2009. – Vol. 72(1). – P. 273–279.
 18. Elad T., Belkin S. Broad spectrum detection and «barcoding» of water pollutants by a genome-wide bacterial sensor array // *Water Res.* – 2013. – Vol. 47(11). – P. 3782–3790.
 19. Hermi M., Mahmoudi E., Beyrem H., Aïssa P., Essid N. Responses of a free-living marine nematode community to mercury contamination: results from microcosm experiments // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2009. – Vol. 56(3). – P. 426–433.
 20. Kahru A., Ivask A., Kasemets K., Põllumaa L., Kurvet I., François M., Dubourguier H.C. Biotests and biosensors in ecotoxicological risk assessment of field soils polluted with zinc, lead, and cadmium // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2005. – Vol. 24(11). – P. 2973–2982.
 21. Lopez-Roldan R., Kazlauskaitė L., Ribo J., Riva M.C., González S., Cortina J.L. Evaluation of an automated luminescent bacteria assay for in situ aquatic toxicity determination // *Sci. Total Environ.* – 2012. – Vol. 440. – P. 307–313.
 22. Malaj E., Von der Ohe P.C., Grote M., Kühne R., Mondy C.P., Usseglio-Polatera P., et al. Organic chemicals jeopardise freshwater ecosystems health on the continentalscale // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. – Vol. 111. – P. 9549–9554.
 23. Ma X.Y., Wang X.C., Ngo H.H., Guo W., Wu M.N., Wang N. Bioassay based luminescent bacteria. Interferences, improvements, and applications // *Sci. Total Environ.* – 2014. – Vol. 468–469. – P. 1–11.
 24. Palchetti I., Mascini M. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring // *Analyst.* – 2008. – Vol. 133(7). – P. 846–854.
 25. Riedel K., Kunze G., König A. Microbial sensors on a respiratory basis for wastewater monitoring // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 75. – P. 81–118.
 26. Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khmelevtsova L.E., Mirina E.A., Kudееvskaya E.M., Rogulin E.A., Rakin A.V. Biosensor-based comparison of the ecotoxicological contamination of the wastewaters of Southern Russia and Southern Germany // *International Journal of Environmental Science and Technology.* – 2016. – Vol. 13(3). – P. 945–954.
 27. Sims I., Crane M., Johnson I., Credland P. Biomonitoring the environmental impact of atmospheric emissions from the Avonmouth zinc smelter. United Kingdom // *Ecotoxicology.* – 2009. – Vol. 18(7). – P. 961–970.
 28. Sousa G.D., Zucchi T.D., Zucchi F.D., Miller R.G., Anjos R.M., Poli P., Zucchi T.M. *Aspergillus nidulans* as a biological system to detect the genotoxic effects of mercury fumes on eukaryotes // *Genet. Mol. Res.* – 2009. – Vol. 8(2). – P. 404–413.
 29. Xu T., Close D.M., Sayler C.S., Ripp S. Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment // *Ecological Indicators.* – 2013. – Vol. 28. – P. 125–141.
 30. Zaki S., Abd-El-Haleem D., Abulhamd A., Elbery H., Abuelreesh G. Influence of phenolics on the sensitivity of free and immobilized bioluminescent *Acinetobacter bacterium* // *Microbiol. Res.* – 2008. – Vol. 163(3). – P. 277–285.
 31. Zhang D., Ding A., Cui S., Hu C., Thornton S.F., Dou J., Sun Y., Huang W.E. Whole cell bioreporter application for rapid detection and evaluation of crude oil spill in sea water caused by Dalian oil tank explosion // *Water Res.* – 2013. – Vol. 47(3). – P. 1191–1200.

INVESTIGATION OF THE SENSITIVITY OF NATURAL STRAINS OF LUMINESCENT BACTERIA *VIBRIO* SP. TO MODEL TOXICANTS FOR THE PURPOSE OF USE AS CELLULAR BACTERIAL BIOSENSORS

M.V. ZHURAVLEVA, Sh.K. KARCHAVA, I.S. SAZYKIN, E.M. KUDEEVSKAYA,
M.I. HAMMAMI, N.V. GNENNAYA, M.A. SAZYKINA

South Federal University, D.I. Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology, Rostov-n-D, Russia

The paper presents the results of the study of sensitivity of natural bioluminescent bacteria *Vibrio* sp., isolated from the Black Sea. The sensitivity of microorganisms to the following model toxicants has been determined: copper sulfate, zinc sulfate, potassium dichromate, sodium dodecyl sulfate, phenol. As a result of the study, the most sensitive strain of luminous bacteria was isolated, which can be used in testing the toxicity of natural objects.

Keywords: luminescent bacteria, pollution, toxicity, biotesting.

ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ПРЯМОГО ГЕМОЛИЗИНА (TDH) И TDH-РОДСТВЕННОГО ГЕМОЛИЗИНА (TRH) *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

О.С. ЧЕМИСОВА*, О.А. РЫКОВСКАЯ, М.В. ПОЛЕЕВА, Е.М. САНАМЯНЦ

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

Проведен поиск продуцентов термостабильного прямого гемолитина (TDH) и TDH-родственного гемолитина (TRH) среди 250 коллекционных штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных на территории России и сопредельных стран с 1973 по 2015 годы. Из числа Канагава-позитивных культур был отобран штамм-продуцент термостабильного прямого гемолитина *V. parahaemolyticus* P-14810/1 (KM-2027), который получен селекцией клеток штамма *V. parahaemolyticus* 958, обладающего повышенной гемолитической и цитотоксической активностями с сохранением стабильности этих признаков при хранении. Уреазапозитивные штаммы *V. parahaemolyticus* представлены *tdh trh*⁺ и *tdh*⁺*trh*⁺ группами вибрионов. Показано, что *in vitro* TRH продуцируется отдельными представителями только первой группы. Из числа исследуемых культур определен штамм-продуцент гемолитина TRH *V. parahaemolyticus* 293 (KM-228) и подобраны условия его культивирования. Данные штаммы депонированы в ГКПБ ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и могут быть использованы для получения гемолитинов при разработке диагностических тест-систем.

Ключевые слова: термостабильный прямой гемолитин (TDH), TDH-родственный гемолитин (TRH), *Vibrio parahaemolyticus*, гемолитическая активность, цитотоксическая активность.

Введение

V. parahaemolyticus — основная причина пищевых токсикоинфекций, особенно в Японии, Юго-Восточной Азии и Приморском крае [11]. Развитие болезни связано с употреблением в пищу сырых или недостаточно термически обработанных морепродуктов, таких как устрицы, креветки, крабы и омары. Почти у всех клинических штаммов отмечается положительная гемолитическая реакция на специальной среде — агаре Вагатацума, получившая название феномена Канагава (КР) [19, 21]. Показано наличие прямой корреляции между Канагава-позитивными штаммами и продукцией термостабильного прямого гемолитина (TDH) [18]. Этот гемолитин проявляет энтеротоксигенные, кардиотоксические и цитотоксические свойства за счет нарушения потока ионов в клетках. Канагава-позитивные и Канагава-промежуточные штаммы рассматриваются как потенциально опасные [13, 22]. У

Канагава-негативных штаммов в большинстве случаев ген *tdh* отсутствует. Однако Канагава-негативные, как и Канагава-промежуточные, штаммы могут содержать *tdh*, который не экспрессируется, либо экспрессируется слабо и непостоянно. Было показано, что утрата КР⁺ фенотипа может быть обусловлена двумя нуклеотидными заменами в промоторной области гена *tdh*. Штаммы с характеристикой *tdh*⁺КР⁻ следует считать потенциально опасными, поскольку одна точечная мутация в промоторе может привести к возникновению КР⁺ клонов [4].

В середине 1980-х годов Канагава-негативные штаммы, ассоциируемые с гастроэнтеритом, стали выделяться во многих различных географических районах [10]. Позже было обнаружено, что эти Канагава-негативные штаммы продуцировали другой гемолитин, названный TDH-родственным, сокращенно TRH [5, 8, 12]. Ген TDH-родственного гемолитина *trh* имеет 70–80%-ную гомологию с геном *tdh* и тесно связан с экспрессией уреазы [16, 20, 23]. Так, Канагава-негативные штаммы *V. parahaemolyticus* способны вызывать гастроэнтерит при наличии у них гена *trh* и являются потенциально опасными [15]. Поэтому для изучения патогенеза заболевания, а также для прикладных целей, связанных с лабораторной диагностикой, необходимы препараты токсинов и, следовательно, их продуценты. Большинство штаммов парагемолитических вибрионов продуцирует токсины в

© 2018 г. Чемисова О.С., Рыковская О.А., Полеева М.В., Санамянц Е.М.

* Автор для переписки:

Чемисова Ольга Сергеевна

к.б.н., и.о. зам. директора по научной работе, зав. МЖК с ЦПВ, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Ростов-на-Дону

E-mail: chemisova@inbox.ru

достаточно низких количествах, что затрудняет в лабораторных условиях дать количественную оценку гемолитической активности данных культур [6]. В связи с этим для оценки продукции токсинов-гемолизина нами были использованы качественные методы анализа гемолиза.

Целью настоящей работы явился подбор штаммов продуцентов термостабильного прямого гемолизина и TDH-родственного гемолизина *Vibrio parahaemolyticus*.

Материалы и методы

Поиск штаммов продуцентов термостабильного прямого гемолизина и TDH-родственного гемолизина проведен среди 250 штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных на территории России и сопредельных стран с 1973 по 2015 годы из коллекции Музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора».

Гемолитическую активность парагемолитических вибрионов изучали в тесте Канагава по способности лизировать эритроциты человека на среде Вагатцума. Суточную бульонную культуру капель наносили в центр пластины агара. Посевы инкубировали при $37 \pm 0,5$ °С. Результат оценивали через 24–48 часов по величине и полноте зоны гемолиза. Штаммы оценивали как Канагава-позитивные, если зона четкого лизиса достигала 3 и более миллиметров, считая от края колонии до наружного края зоны. При зоне менее 3 мм результат оценивали как слабо положительный [2].

Уреазную активность регистрировали на среде Кристенсена по изменению ее цвета через 24–48 часов после инкубации при 37 °С. При положительном результате среда окрашивается в малиновый цвет [2].

Экспрессию гена *trh* регистрировали в объемной реакции лизиса эритроцитов кур, поставленной в микропланшетах. Для постановки реакции использовали супернатанты культур нативные и прогретые при 60 °С в течение 10 минут. Культуры выращивали на среде, предложенной Honda T. et al. [9], Nakaguchi Y. et al. [14] и LB при 37 °С в стационарных условиях и с дополнительным аэрированием в течение суток (4, 20 и 48 часов). Предварительный учет результатов проводили через 2 часа, окончательный — через 48 часов. При положительной реакции наступал полный или частичный лизис эритроцитов (лаковая кровь).

У всех исследуемых штаммов была проведена ПЦР-детекция генов *tdh* и *trh* [1] с использованием праймеров, предложенных Hayashi S. et al., [7] (табл. 1).

Цитотоксичность определяли на культуре клеток мышечных фибробластов L-929 [3].

Таблица 1

Праймеры, использованные в работе

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров	Длина ампл., п.н
tdh	Ссactaccactctcatatgc	251
	Ggtactaaatggctgacatc	
trh	Tggcttcgatatttcagtatct	485
	Cataacaacatagccattccg	

Результаты и обсуждение

На первом этапе нашей работы все исследуемые штаммы *V. parahaemolyticus* были протестированы на наличие гемолитической активности на среде Вагатцума (тест Канагава) и генов *tdh* и *trh* (методом ПЦР). При сравнительном изучении гемолитической активности парагемолитических вибрионов на среде Вагатцума и наличии в геноме основных детерминант патогенности — термостабильного прямого гемолизина и TDH-родственного гемолизина было показано, что большинство *tdh⁺trh⁻* штаммов было Канагава-позитивным (рис. 1), тогда как большинство *tdh⁻trh⁻* штаммов не вызывало гемолиза (Канагава-негативные), что совпадает с литературными данными.

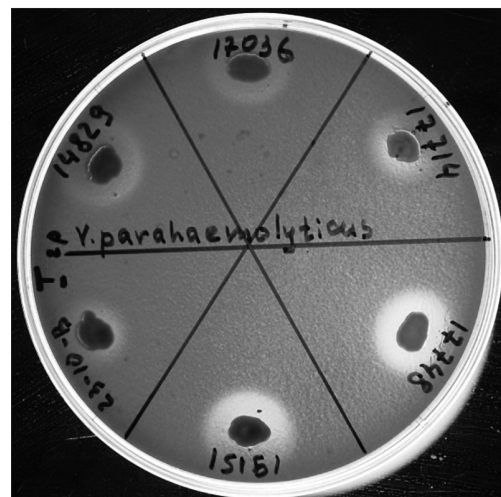


Рис.1. Канагава-позитивные клинические штаммы *V. parahaemolyticus*

По результатам теста Канагава исследуемые культуры были разделены на 3 группы, приведенные в таблице 2.

Первая группа включала в себя Канагава-позитивные штаммы (KP^+), которые образовывали на среде

Вагатцума четкую зону β -гемолиза, вторая — Канагава слабо позитивные (промежуточные) (KP^{+}), у которых слабовыраженная зона неполного гемолиза наблюдалась

не во всех повторностях опыта, и третья — Канагава-негативные (KP^{-}), то есть полностью лишённые гемолитической активности.

Таблица 2

Результаты оценки патогенности парегемолитических вибрионов по фенотипическим признакам (тест Канагава)

Количество штаммов, выделенных:											
от больных (107), из них:			от вибрионосителей (16), из них:			из морской воды (105), из них:			от гидробийонтов (22), из них:		
KP^{+}	KP^{+}	KP^{-}	KP^{+}	KP^{+}	KP^{-}	KP^{+}	KP^{+}	KP^{-}	KP^{+}	KP^{+}	KP^{-}
84	3	20	-	3	13	1	2	102	1	-	21

Как показано в таблице 2, KP^{+} штаммы выделены преимущественно от больных. Культуры, изолированные от вибрионосителей и из объектов окружающей среды, за редким исключением, отнесены к Канагава-негативным, то есть авирулентным. У 8 KP^{+} штаммов оценка вирулентности по этому тесту вызывала затруднение. 19% KP^{-} культур, выделенных от больных, не обладали способностью лизировать эритроциты на среде Вагатцума.

Далее мы из числа всех протестированных штаммов провели отбор штаммов, величина зоны гемолиза которых через 48 часов составила 5 мм. Затем у отобранных штаммов с высокой гемолитической активностью дополнительно осуществили оценку цитотоксических свойств на культуре клеток L-929 (рис. 2). Наибольшая цитотоксическая активность была выявлена у $tdh^{+}trh^{-}$ штамма *V. parahaemolyticus* 958, выделенного от больного в 1974 году в г. Новороссийске (серогруппа O4:K12).

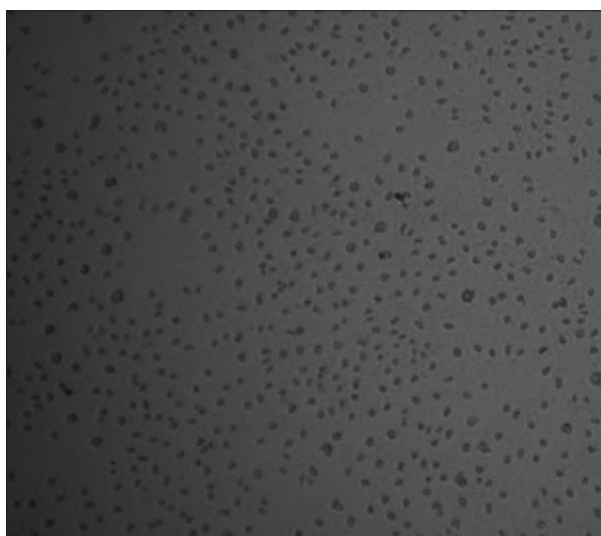


Рис. 2. Цитотоксический эффект на культуре L-929

Затем путем селекции клеток данного штамма был получен клон *V. parahaemolyticus* P-14810/1, у которого

величина зоны гемолиза составила 7 мм, а при проверке цитотоксических свойств на культуре тканей были отмечены изменения морфологии и гибель клеток культур L-929, Нер-2 и McCoу.

Большинство клинических штаммов, изолированных в период с 1996 года, относится к «пандемичной» группе преимущественно серогруппы O3:K6. Однако отобранный нами штамм относится к серогруппе O4:K12, так как использование продуцируемого этим штаммом токсина при получении диагностических сывороток к нему позволит избежать неспецифической реакции с O3 и K6 антигенами при определении вирулентности культур.

Таким образом, выявленная высокая гемолитическая и цитотоксическая активность данного штамма, а также стабильность указанных признаков, которая была проверена в течение многократных пассажей, может служить основанием для использования его в качестве продуцента TDH.

С целью поиска штамма-продуцента гемолизина TRH изучена способность парегемолитических вибрионов продуцировать гемолизин *in vitro*. Известно, что ею обладают уреазопозитивные вибрионы, так как ген, контролирующий синтез TRH, сцеплен с кластером генов уреазы на малой хромосоме. Из числа всех изученных штаммов мочевину на среде Кристенсена ферментировали 11, их характеристика представлена в таблице 3.

При ПЦР-тестировании установлено, что все уреазопозитивные вибрионы содержали структурный ген гемолизина TRH. У шести штаммов, помимо *trh*, выявлен ген *tdh*, то есть все уреазопозитивные изоляты относились к двум группам: $tdh^{-}trh^{+}$ и $tdh^{+}trh^{+}$.

При оценке способности уреазопозитивных изолятов продуцировать TRH мы руководствовались его избирательной литической активностью по отношению к эритроцитам кур. На этой модели была прослежена экспрессия *trh* гена вибрионов, выращенных на среде,

рекомендованной Honda T. et al. [9], Nakaguchi Y. et al. [14] и LB в стационарных условиях и с дополнительным аэрированием. О продукции TRH судили по лизису эритроцитов в разведениях супернатантов. В сравнительных опытах были использованы четыре группы культур: $tdh^+trh^+Ure^+$ — 5 штаммов, $tdh^+trh^+Ure^-$ — 6 штаммов и по 10 штаммов $tdh^+trh^-Ure^-$ и $tdh^-trh^-Ure^-$.

Вибрионы, лишенные trh гена, как tdh^+ , так и tdh^- , не лизировали эритроциты кур. Продукция TRH выявлена преимущественно при культивировании с дополнительным аэрированием на среде, рекомендованной Honda T. et al. [9]. В отдельных случаях положительные находки отмечены в культурах, выросших в стационарных условиях.

Таблица 3

Характеристика уреазопозитивных штаммов *V. parahaemolyticus*

Штаммы	Источник выделения	Место и год выделения	Серогруппа	КР	Уреаза	Наличие генов	
						<i>trh</i>	<i>tdh</i>
16754	больной	Новороссийск, 1976	нд	+/-	+	+	+
17080	носитель	Туркмения, 1983	O6:K18	+/-	+	+	+
17084	-	Туркмения, 1983	O6:K18	+/-	+	+	+
17101	носитель	Туркмения, 1985	O6:K18	+/-	+	+	+
17140	больной	Бердянск, 1986	нд	-	+	+	+
23-10В	больной	Владивосток, 2010	нд	+/-	+	+	+
13580	больной	Япония, 1971 (типовой штамм)	нд	-	+	+	-
16763	больной	Керчь, 1977	нд	-	+	+	-
16976	-	Бердянск, 1984	нд	-	+	+	-
17078	носитель	Туркмения, 1983	нд	-	+	+	-
293	-	Туркмения, 1985	O1:K25	-	+	+	-

Таблица 4

Литическая активность tdh^+trh^+ парагемолитических вибрионов по отношению к эритроцитам кур

№ штамма	Среды культивирования	Гемолитическая активность в стационарных условиях										Гемолитическая активность при дополнительном аэрировании									
		Супернатанты нативные					Супернатанты гретье					Супернатанты нативные					Супернатанты гретье				
		В опытах					В опытах					В опытах					В опытах				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
17078	1. spp. (Honda T. et al.)	-	1/2	-	-	-	-	-	-	-	1/4	1/128	1/128	-	1/64	1/512	1/8	1/32	-	1/4	1/16
	2. Nakaguchi	1/8	-	-	1/4	-	-	-	-	-	-	1/8	1/8	-	1/8	-	-	-	-	-	-
	3. LB	1/4	1/8	-	1/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/2	-	-	-	-	-	-
293	1. spp. (Honda T. et al.)	-	1/16	1/8	1/64	-	-	-	-	-	-	1/128	1/128	1/128	1/64	1/256	-	-	1/4	-	1/32
	2. Nakaguchi	-	1/128	-	1/256	-	-	-	-	-	-	-	1/16	1/8	1/16	1/8	-	-	-	-	-
	3. LB	-	1/64	1/8	1/64	1/4	-	-	-	-	-	-	1/4	1/2	1/4	-	-	-	-	-	-

Показано, что продукция TRH наблюдалась только у уреазопозитивных штаммов, но не все Ure^+ вибрионы секретируют TRH *in vitro*, что подтверждает существующее мнение о независимой экспрессии генов trh и уреазного кластера [17]. В группе $tdh^+trh^+Ure^+$ *V. parahaemolyticus* только у 2 из 5 отмечена экспрессия гена trh *in vitro*. Сведения о них представлены в таблице 4.

Титр гемолизина этих штаммов составил 1/128—1/256. Обусловленность лизиса гемолизином TRH подтверждалась тем, что прогревание культур при 60 °C в течение 10 минут приводило к утрате гемолитической активности. Известно, что TRH, в отличие от TDH, при

таком тепловом воздействии термолабилен [9]. Интересно отметить, что уреазопозитивные вибрионы, в геноме которых присутствовали одновременно гены tdh и trh , не экспрессировали их *in vitro*. Такие штаммы были слабо активны в тесте Канагава и не проявляли активности по отношению к эритроцитам кур в объемной реакции гемолиза. По предположению японских исследователей, этот факт объясняется существованием неуреазного фактора, ассоциированного с низким уровнем продукции гемолизинов у штаммов, обладающих одновременно генами tdh и trh [14].

Для выявления оптимальных условий продукции TRH парагемолитические вибрионы инкубировали в те-

чение 4, 20 и 48 часов. Максимальная продукция гемолизина выявлена при культивировании в течение 20 часов. Кроме того, установлено, что у штаммов, формирующих 2 типа колоний — «оптически плотные» и «прозрачные», гемолитическая активность по отношению к эритроцитам кур более выражена у «прозрачного» клона.

Из числа штаммов, секретирующих TRH *in vitro* в качестве продуцента гемолизина TRH, был выбран штамм *V. parahaemolyticus* 293.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования изучена гемолитическая активность коллекционных штаммов *V. parahaemolyticus* разных генотипов в тесте Канагава и цитотоксическая активность на культуре клеток. По результатам теста Канагава исследуемые культуры были разделены на 3 группы: Канагава-позитивные, Канагава-промежуточные и Канагава-негативные. Из числа Канагава-позитивных и содержащих геном *tdh* был выбран клон *V. parahaemolyticus* P-14810/1, обладающий высокой гемолитической активностью, определяемой на среде Вагатцума, и цитотоксической — на культуре клеток L-929.

Из коллекции культур парагемолитических вибрионов выделено 11 уреазопозитивных штаммов, имеющих геном *trh*. Уреазопозитивные штаммы *V. parahaemolyticus* представлены *tdh trh*⁺ и *tdh*⁺*trh*⁺ группами вибрионов. Показано, что *in vitro* TRH продуцируют отдельные представители только первой группы, у которых найдена гемолитическая активность. Подобраны оптимальные условия экспрессии гена *trh*. Максимальная продукция гемолизина выявлена при культивировании в течение 20 часов. Продукция TRH обнаружена преимущественно при культивировании с дополнительным аэрированием и при использовании нативных супернатантов штаммов, выращенных на среде, рекомендованной Honda T. et al. [9]. Из числа исследуемых культур определен штамм-продуцент гемолизина TRH *V. parahaemolyticus* 293.

Полученные штаммы-продуценты TDH и TRH депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ГКПБ ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора» под номерами КМ-2027 и КМ-228 соответственно. Они могут быть использованы для получения гемолизинов при разработке диагностических тест-систем, контрольных панелей для проверки качества лабораторной диагностики.

Литература

1. МУК 1.3.2569–09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 22.12.2009).
2. МУК 4.2.2046–06. Методы выявления и определения парагемолитических вибрионов в рыбе, нерыбных объектах промысла, продуктах, вырабатываемых из них, воде поверхностных водоемов и других объектах: Методические указания. — М. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. — 26 с.
3. Чемисова О.С., Рыковская О.А., Смоликова Л.М., Даликова Р.Р., Алексеева Л.П., Татаренко О.А. Изучение биологической активности штаммов *Vibrio parahaemolyticus* // *Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии.* — Ростов-н-Д., 2012. — Вып. 25. — С. 137–140.
4. Шалу О.А., Писанов Р.В., Монахова Е.В. Эффективность экспрессии гена *tdh* *Vibrio parahaemolyticus* зависит от двух точковых мутаций в его промоторной области // *Генетика.* — 2012. — Т. 48(12). — С. 1364–1371.
5. Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Matarrese P., Casierra A., Katouli M., Kuhn I., Mollby R., Brusscolini F., Donelli G. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1999. — Vol. 65(6). — P. 2748–2753.
6. Bechlars S., Wüstenhagen D., Dräger K., Dieckmann R., Strauch E., Kubick S. Cell-free synthesis of functional thermostable direct hemolysins of *Vibrio parahaemolyticus* // *Toxicon.* Elsevier. — 2013. — Vol. 76. — P. 132–142.
7. Hayashi S., Okura M., Osawa R. Soft-agar-coated filter method for early detection of viable and thermostable direct hemolysin (TDH)- or TDH-related hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2006. — Vol. 72(7). — P. 4576–4582.
8. Hervio-Heath D., Colwell R.R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.-M., Pommereuy M. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France // *J. Appl. Microbiol.* — 2002. — Vol. 92(6). — P. 1123–1135.
9. Honda T., Ni Y., Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin // *Infect. Immun.* — 1988. — Vol. 56(4). — P. 961–965.
10. Hondo S., Goto I., Minematsu I., Ikeda N., Asano N., Ishibashi M., Kinoshita Y., Nishibuchi M., Honda T., Miwatani T. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus* // *Lancet.* — 1987. — Vol. 329(8528). — P. 331–332.

11. Joseph S.W., Colwell R.R., Kaper J.B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios // Crit. Rev. Microbiol. — 1982. — Vol. 10(1). — P. 77–124.
12. Matté G.R., Matté M.H., Sato M.I.Z., Sanchez P.S., Rivera I.G., Martins M.T. Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil // J. Appl. Bacteriol. — 1994. — Vol. 77(3). — P. 281–287.
13. Naim R., Pasaribu F., Iida T., Honda T. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin disrupts actin and activates caspase-3 in Rat-1 cells // African Journal of Microbiology. — 2011. — Vol. 5(24). — P. 4118–4123.
14. Nakaguchi Y., Okuda J., Iida T., Nishibuchi M. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of the thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH-related hemolysin gene // Microbiol. Immunol. — 2003. — Vol. 47(3). — P. 233–239.
15. Ni Y., Honda T., Miwatani T. Studies on a new V_p – TDH related hemolysin (V_p – TRH) produced by clinical isolates of Kanagawa phenomenon negative *Vibrio parahaemolyticus* // J. Toxicol. Toxin. Rev. — 1990. — Vol. 9(1). — P. 124.
16. Nishibuchi M., Kaper J.B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium // Infect. Immun. — 1995. — Vol. 63(6). — P. 2093–2099.
17. Park K.S., Iida T., Yamaichi Y., Oyagi T., Yamamoto K., Honda T. Genetic characterization of DNA region containing the trh and ure genes of *Vibrio parahaemolyticus* // Infect. Immun. — 2000. — Vol. 68(10). — P. 5742–5748.
18. Park K.S., Ono T., Rokuda M., Jang M.H., Iida T., Honda T. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus* // Microbiol. Immunol. — 2004. — Vol. 48(4). — P. 313–318.
19. Raimondi F., Kao J.Y., Florentini K., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A., Fasano A. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in in vitro systems // Infect. Immun. — 2000. — Vol. 68(6). — P. 3180–3185.
20. Robert-Pillot A., Guenole A., Fournier J.M. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species: validation by DNA-DNA hybridization // FEMS Microbiol. Lett. — 2002. — Vol. 215(1). — P. 1–6.
21. Twedt R.M., Novelli R.E., Spaulding P.L., and Hall H.E. Comparative hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus* and related vibrios // Infect. Immun. — 1970. — Vol. 1(4). — P. 394–399.
22. Sakazaki R., Tamura K., Kato T., Obara Y., Yamai S., Hobo K. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity // J. Med. Sci. Biol. — 1968. — Vol. 21(5). — P. 325–331.
23. Sunen E., Acebes M., Fernandez-Asterga A. Occurrence of potentially pathogenic vibrios in bivalve molluscs (mussels and clams) from retail outlets in the north of Spain // J. of Food Safety. — 1995. — Vol. 15(3). — P. 275–281.

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS STRAINS-PRODUCERS OF THERMOSTABLE DIRECT HEMOLYSIN (TDH) AND TDH-RELATED HEMOLYSIN (TRH)

O.S. CHEMISOVA, O.A. RYKOWSKAYA, M.V. POLEEVA, E.M. SANAMYANTS

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

The search for producers of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) among the 250 collection *V. parahaemolyticus* strains, isolated on the territory of Russia and neighboring countries from 1973 to 2015 was carried out. From Kanagawa-positive cultures we harvested the *V. parahaemolyticus* strain P-14810/1 (KM-2027), the producer of thermostable direct hemolysin, obtained by selection of the cells of the *V. parahaemolyticus* 958 strain which possessed high hemolytic and cytotoxic activities and maintained stability of these characteristics under storage. Urease-positive *V. parahaemolyticus* strains were presented by *tdh⁺ and *tdh⁺trh⁺* groups of vibrios. It is shown that in vitro TRH is produced by individual members of only the first group. Among the studied cultures the *V. parahaemolyticus* 293 (KM 228) strain-producer of hemolysin TRH was identified and the conditions of its cultivation were determined. These strains are deposited in the State Committee for Occupational Safety and Health of the Russian Federal Scientific Research Institute of Anti-plague «Microbe» of Rospotrebnadzor and can be used for obtaining hemolysins in the development of diagnostic test systems.*

Keywords: thermostable direct hemolysin (TDH), TDH-related hemolysin (TRH), *Vibrio parahaemolyticus*, hemolytic activity, cytotoxic activity.

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КАЛЬПАИНОВ И СОДЕРЖАНИЯ ТИТИНА И НЕБУЛИНА В ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА (*SPERMOPHILUS UNDULATUS*)

Я.А. ЮЦКЕВИЧ^{1*}, С.С. ПОПОВА², Н.Н. САЛМОВ², А.Д. УЛАНОВА^{2,3},
Н.М. ЗАХАРОВА⁴, И.М. ВИХЛЯНЦЕВ^{2,3*}

¹ Кубанский государственный университет, Краснодар;

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,

³ Пушчинский государственный естественно-научный институт,

⁴ Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской обл.

Исследованы сезонные изменения протеолитической активности μ - и m -кальпаинов, а также содержания гигантских белков саркомерного цитоскелета титина и небулина в миокарде и скелетной мышце (*m. longissimus dorsi*) длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus*. Методом казеиновой зимографии зарегистрирована гиперактивация *in vitro* кальпаиновых протеаз в белковых экстрактах, полученных из миокарда и *m. longissimus dorsi* сусликов периода гибернации: группы «Зимняя активность» (в $\approx 2,4$ и $\approx 1,8$ раза, соответственно, $p \leq 0,01$) и группы «Гипотермия» (в $\approx 2,0$ и $\approx 1,3$ раза, соответственно, $p \leq 0,01$), по сравнению с активностью этих ферментов, выделенных из мышц животных группы «Летняя активность». Методом ДСН-ПААГ-электрофореза не обнаружено достоверных различий в содержании небулина в *m. longissimus dorsi* сусликов трех исследуемых групп, однако зарегистрировано снижение (на $\approx 13\%$, $p \leq 0,01$) содержания титина-1 (Т1) в миокарде и скелетной мышце сусликов группы «Гипотермия» относительно содержания этих белков в мышцах животных группы «Летняя активность». Достоверных различий в содержании Т1 в исследованных поперечнополосатых мышцах сусликов из групп «Летняя активность» и «Зимняя активность» не зарегистрировано, что свидетельствует о восстановлении нормального содержания титина в мышцах сусликов в период «зимней» активности. С использованием флуоресцентного красителя фосфатных групп белков Pro-Q Diamond обнаружено увеличение (в $\approx 1,6$ раза, $p \leq 0,01$) степени фосфорилирования Т1 в *m. longissimus dorsi* животных группы «Гипотермия» по сравнению с уровнем фосфорилирования этого белка в мышце «летних» активных животных. В миокарде сусликов группы «Гипотермия», наоборот, зарегистрировано снижение (на $\approx 23\%$, $p \leq 0,01$) уровня фосфорилирования титина. Обсуждается роль выявленных изменений в снижении степени развития мышечной атрофии у зимнеспящих в течение длительного гибернационного сезона.

Ключевые слова: гибернация, длиннохвостый суслик *Spermophilus undulatus*, поперечнополосатые мышцы, миокард, титин, небулин, μ -кальпаин, m -кальпаин, фосфорилирование.

Введение

Зимняя спячка (гибернация) — эволюционно закрепленное физиологическое состояние у некоторых гомойотермных животных, при котором происходит

снижение интенсивности процессов жизнедеятельности организма с целью уменьшения энергетических затрат и выживания в неблагоприятных условиях среды, в частности, при низких температурах и бескормице. Длиннохвостый суслик *Spermophilus undulatus* является истинным (облигатным) гибернантом. Спячка, сопровождающаяся гипотермией и многократным снижением метаболизма, у этих животных может длиться 6–7 мес., прерываясь кратковременными периодами активности (эутермии) [5]. Известно, что за время спячки отмечаются атрофические изменения в скелетных мышцах гибернантов [21, 30]. Подобные изменения происходят в мышцах незимнеспящих млекопитающих и человека в условиях вынужденной продолжительной гипокинезии, а также моделируемой и реальной микрогравитации [16,

© 2018 г. Юцкевич Я.А., Попова С.С., Салмов Н.Н., Уланова А.Д., Захарова Н.М., Вихлянцева И.М.

* Авторы для переписки:

Юцкевич Яна Андреевна

Кубанский государственный университет

E-mail: yana.yutskevich@gmail.com

Вихлянцева Иван Милентьевич

д.б.н., и.о. зав. лабораторией Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН

E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

51]. Показано, что степень выраженности атрофических изменений в мышцах человека и животных в условиях микрогравитации в 2–3 раза выше, чем в мышцах гибернантов после одинаковых временных периодов мышечной неволеваемости [30]. Кроме того, в мышцах, атрофированных в условиях гравитационной разгрузки, после восстановления нагрузки в условиях земной гравитации описаны нарушения высоко упорядоченной саркомерной структуры и зарегистрировано значительное ухудшение сократительных свойств [14, 40, 51]. Подобных изменений в атрофированных мышцах зимнеящих животных не зарегистрировано [30, 51, 57]. Для восстановления нормальных структурно-функциональных параметров атрофированной в условиях микрогравитации мышцы требуется нескольких недель или месяцев [18, 28]. Зимнеящие животные после продолжительного периода обездвиженности и мышечной неволеваемости выходят из состояния гипотермии в течение 2–3 ч без нарушений саркомерной структуры и значительного снижения сократительной способности поперечнополосатых мышц [21, 30, 51, 57] с сохранением обычной двигательной активности. Диафрагма и сердечная мышца у большинства гибернантов проявляют устойчивость к атрофии, хотя у некоторых из них, как, например, у золотистого суслика (*Spermophilus lateralis*) обнаруживается гипертрофия этих мышц в период гипотермии [39, 54].

Молекулярные механизмы уникальной пластичности поперечнополосатых мышц зимнеящих млекопитающих во многом неясны. Один из механизмов, ответственных за устойчивость мышц гибернантов к атрофии, предположительно, может заключаться в активации Ca^{2+} -кальцинейрин-NFAT сигнального пути в период пробуждения, который сопровождается разогревом животного [58]. Важную роль в активации этого сигнального каскада, ответственного, в частности, за гипертрофические изменения в мышцах, играет кальпаин-опосредованная активация кальцинейрина [56]. Известны данные о гиперактивации белкового синтеза в поперечнополосатых мышцах зимнеящих в периоды выхода из состояния гипотермии и кратковременной «зимней» активности (нормотермии) [31, 55, 59]. Нельзя исключить, что важную роль при этом играют кальпаиновые протеазы, которые протеолизуют белки саркомерного цитоскелета и тем самым запускают белковый обмен в саркомерах.

Кальпаины — семейство широко распространенных цитозольных Ca^{2+} -активируемых цистеиновых протеаз [45]. К настоящему времени известно 16 компонентов кальпаиновой системы у млекопитающих: 15 каль-

паиновых протеаз и ингибитор — кальпастатин [23, 24]. В поперечнополосатых мышцах животных основными по содержанию и наиболее распространенными являются μ -кальпаин (активируется при микромолярных концентрациях ионов кальция — 2–200 μM) и m -кальпаин (активируется при субмиллимолярных концентрациях ионов кальция — 400–800 μM) [15, 24]. В мышцах млекопитающих также экспрессируются и другие кальпаины, в частности, кальпаин 3 — в скелетных мышцах [3] и кальпаины 9 и 10 — в сердечной мышце [19].

Известно, что ряд миофибриллярных белков толстых и тонких нитей в мышечных саркомерах, в том числе, гигантские белки саркомерного цитоскелета титин и небулин, подвергается протеолизу кальпаинами, в частности, μ -кальпаином, что показано в исследованиях *in vitro* [24, 35]. Высказано предположение, что белковый обмен в мышечных клетках инициируется кальпаин-зависимым протеолизом титина, небулина и других саркомерных белков с последующей деградацией их фрагментов до аминокислотных остатков по убиквитин-протеасомному пути [23]. Показано, что увеличение активности кальпаинов в скелетных мышцах млекопитающих в условиях гравитационной разгрузки [22, 42, 47] вносит вклад в развитие атрофии, сопровождающейся повышенным протеолизом титина и небулина [9, 13, 48, 51], а также увеличением уровня фосфорилирования титина [49]. Есть данные о том, что развитие гипертрофии сердечной мышцы у спонтанно гипертензивных крыс (SHR) сопровождается снижением содержания N2BA-изоформы титина [53] или обеих (N2BA и N2B) изоформ этого белка [6], что может быть следствием повышенной активности кальпаинов. Нельзя исключать, что вышеуказанные изменения, наблюдаемые в мышцах незимнеящих животных и человека при развитии атрофии или гипертрофии, будут наблюдаться и в поперечнополосатых мышцах гибернантов в период зимней спячки.

В представленной работе было исследовано, происходят ли сезонные изменения протеолитической активности кальпаинов (μ и m), содержания титина и небулина, а также уровня фосфорилирования титина в сердечной (миокард левого желудочка) и скелетной (*m. longissimus dorsi*) мышцах длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus*.

Материалы и методы

В работе использовали длиннохвостых сусликов *Spermophilus undulatus*, отловленных в Якутии и содержащихся в условиях вивария Института биофизики

клетки РАН (ИБК РАН) (Пушино). В экспериментах исследовали животных обоих полов, массой тела 510–640 г, находящихся в состояниях «летней» активности (нормотермия, 38 °С, май–сентябрь) и в гибернационный период: гипотермия (глубокое оцепенение, декабрь–март, температура сердечной мышцы 1,5–2,0 °С; продолжительность периода гипотермии 4–11 суток), «зимняя» активность (нормотермия, 36–37 °С, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии; взятие материала через 12–14 ч эутермного состояния после пробуждения). Процедура мониторинга и отбора животных подробно описана в работе [5]. Все манипуляции, связанные с экспериментами на животных, были одобрены Комиссиями по биомедицинской этике ИБК РАН и Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН).

Были использованы образцы миокарда левого желудочка и скелетной мышцы (*m. longissimus dorsi*), которая содержит волокна, экспрессирующие преимущественно I (медленную) и IIa (быструю) изоформы тяжелых цепей миозина. Образцы мышц замораживали в жидком азоте и хранили при -75 °С.

Активность *in vitro* μ -и *m*-кальпаинов, присутствующих в белковом экстракте, полученном из мышечного гомогената, исследовали методом казеиновой зимографии [38]. Гель-электрофорез белков в неденатурирующих условиях проводили в вертикальных пластинах 9%-ного полиакриламидного геля размером 80×100 мм. В качестве субстрата для кальпаинов гели содержали казеин. После окончания электрофореза гель переносили в раствор, содержащий 5 мМ CaCl₂, для активации кальпаиновых протеаз. Процедуру проводили в течение 15 часов при температуре +25 °С. Затем гель окрашивали Coomassie brilliant blue R-250 и G-250, смешанными в пропорции 1:1.

Для электрофоретического разделения небулина (мол. м. \approx 700 кДа), высокомолекулярных изоформ (N2B, N2BA, N2A, NT, мол. м. 3000–3700 кДа) интактного титина-1 (T1) и его протеолитических T2-фрагментов использовали крупнопористый 2,1–2,2%-ный ПААГ в присутствии Ds-Na с содержанием агарозы 0,5–0,6%, приготовленный по методу Татсуми –Хаттори [46] с нашими модификациями [52]. В частности, подготовку проб проводили по методу, исключающему их нагревание выше 40 °С [52] с целью предотвращения разрушения титина под действием более высоких температур.

Концентрацию общего белка перед проведением гель-электрофореза определяли спектрофотометрическим методом, используя Nano Drop ND-1000 («Nano

Drop Technologies», США). На дорожки в геле наносили одинаковое содержание общего белка.

Уровень фосфорилирования титина оценивали с помощью флуоресцентного красителя фосфатных групп белков Pro-Q Diamond («Invitrogen», США) по методу [17] с незначительными модификациями, описанными ниже. После проведения электрофореза гель фиксировали в течение 12–18 ч в растворе, содержащем 50%-ный этанол и 10%-ную уксусную кислоту. После 30-минутной отмывки в дистиллированной воде гель окрашивали в течение 1,5 ч красителем Pro-QDiamond. Окрашенный гель отмывали в готовом растворе (Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gel Destaining Solution, «Invitrogen», США) в течение 1,5 ч. Белковые полосы, содержавшие фосфатные группы, визуализировали с помощью системы гель-документирования и оценки содержания фосфатных групп в белках (Pharos FXPlus Molecular Image, «Bio-Rad», США). Далее гели окрашивали Coomassie brilliant blue G-250 и R-250, смешанными в пропорции 1:1, для контрольной оценки содержания белка.

Отмытые гели сканировали, оцифровывали (с разрешением не менее 600×600 пикселей) и затем проводили денситометрическую обработку с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11. Содержание титина и небулина оценивали по отношению к содержанию тяжелых цепей миозина согласно методу [20]. Данный способ оценки содержания титина и небулина широко используется и является более точным, чем способ оценки содержания этих белков по отношению к содержанию общего белка в пробе.

Статистическую обработку проводили с применением непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Этот критерий предназначен для оценки количественных различий признака между двумя малыми выборками, когда выборка 1 и выборка 2 равны трем или больше значениям *n*, или выборка 1 равна двум, а выборка 2 равна пяти или больше значениям *n*. Вышеуказанный критерий сильнее Q-критерия Розенбаума [4]. Таким образом, при отсутствии резких отклонений тестируемых показателей в выборках U-критерий Манна – Уитни позволяет выявить статистически значимые различия между двумя малыми выборками. В нашей работе значимыми считали различия при $p \leq 0,01$.

На графиках, отражающих изменения содержания и уровня фосфорилирования гигантских белков саркомерного цитоскелета, а также изменения протеолитической активности кальпаинов, контрольные значения принимали за 100%. При этом в каждом отдельно взятом эксперименте принималось среднее значение от не менее

2–3 контрольных образцов, присутствующих в геле. Стандартные отклонения при этом составили: не более 7% при средних значениях, отражающих содержание титина и небулина; не более 10% при средних значениях, отражающих уровень фосфорилирования титина; не более 12% при средних значениях, отражающих уровень протеолитической активности кальпаинов.

Результаты и обсуждение

1. Сезонные изменения активности кальпаинов в поперечнополосатых мышцах суслика

Принимая во внимание данные об активации Ca^{2+} -кальцинейрин-NFAT сигнального пути, ответственного, предположительно, за гипертрофический ответ в мышцах тринадцатиполосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) в периоды гипотермии и выхода из спячки [58], а также данные об активации белкового синтеза и, в частности, mTOR-сигнального пути синтеза белка в мышцах гибернантов во время пробуждения и «зимней» активности [31, 55, 59], мы предполагали обнаружить увеличение активности *in vitro* μ - и m -кальпаинов, присутствующих в белковом экстракте, полученном из гомогената мышц «зимних» (эутермных) животных. Данное предположение нашло подтверждение в наших исследованиях. В частности, способность μ - и m -кальпаинов протеолизировать казеин в геле была достоверно выше в экстрактах, полученных из *m. longissimus dorsi* (в $\approx 1,8$ раза, $p \leq 0,01$) и сердечной мышцы (в $\approx 2,4$ раза, $p \leq 0,01$) нормотермных «зимних» сусликов в сравнении с активностью этих ферментов, полученных из мышц «летних» активных животных (рис. 1). С этими результатами согласуются

полученные нами ранее данные Вестерн-блот анализа, свидетельствующие об активации μ -кальпаина *in vivo* в скелетных мышцах сусликов [10]. Известно, что активация интактного μ -кальпаина (80 кДа) сопровождается его аутолизом с образованием фрагментов с мол. м. 78 и 76 кДа, которые также обладают протеолитической активностью [36]. Ранее в наших исследованиях было обнаружено, что в *m. longissimus dorsi*, а также в *m. soleus* активных «зимних» сусликов содержание аутолизированных фрагментов μ -кальпаина было в 1,9 и 1,75 раза, соответственно, выше по сравнению с их содержанием в мышцах сусликов, находящихся в состоянии «летней» активности или во время гипотермии [10]. Полученные данные позволяют сделать заключение о гиперактивации кальпаиновых протеаз в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика в период «зимней» активности. Известны данные, полученные методом Вестерн-блоттинга, свидетельствующие об увеличении содержания μ -кальпаина (кальпаина-1) в скелетных мышцах тринадцатиполосного суслика в период спячки [58]. С большой долей вероятности можно утверждать, что эти изменения также будут сопровождаться гиперактивацией кальпаинов при пробуждении (саморазогреве, переходе из гипотермного состояния в нормотерное) и в периоды кратковременной «зимней активности» у тринадцатиполосного суслика.

На рисунке 1 представлены данные, свидетельствующие о достоверном увеличении *in vitro* активности кальпаинов в белковых экстрактах, полученных из сердечной мышцы (в ≈ 2 раза, $p \leq 0,01$) и *m. longissimus dorsi* (в $\approx 1,3$ раза, $p \leq 0,01$) сусликов, находящихся в состоянии гипотермии (см. рис. 1).

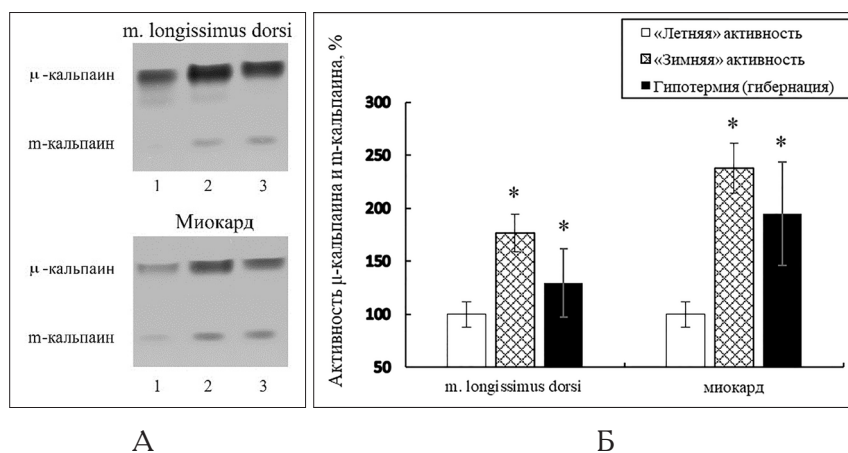


Рис. 1. Сезонные изменения протеолитической активности кальпаинов поперечнополосатых мышц суслика (*Spermophilus undulatus*). А — казеиновая зимография (негативное изображение): 1 — «летние» активные суслики ($n=6$); 2 — «зимние» активные ($n=6$); 3 — спячка (гипотермия) ($n=6$). Б — диаграммы, показывающие сезонные изменения активности *in vitro* μ -кальпаина и m -кальпаина поперечнополосатых мышц сусликов. $M \pm SD$, $*p < 0,01$ (в сравнении с группой «летние» активные суслики)

В условиях гипотермии, когда температура поперечнополосатых мышц суслика составляет 0–5 °С, активность кальпаинов будет полностью или значительно ингибирована. Однако полученные результаты могут свидетельствовать о подготовленности кальпаиновой системы поперечнополосатых мышц суслика к гиперактивации в процессе пробуждения или в период «зимней» активности, что подтверждается нашими результатами, полученными методом казеиновой зимографии (см. рис. 1).

Физиологическая роль выявленных изменений может заключаться в снижении или предотвращении развития атрофии в мышцах зимнеящих сусликов в течение гибернационного сезона. Во-первых, кальпаино-опосредованная активация Ca^{2+} -кальцинейрин-NFAT сигнального пути может вызвать гипертрофический ответ в мышцах гибернантов в периоды пробуждения и «зимней» активности. Во-вторых, повышенный кальпаино-опосредованный протеолиз белков саркомерного цитоскелета будет усиливать белковый обмен в мышечных клетках. Данные о гиперактивации белкового синтеза и, в частности, mTOR-сигнального пути синтеза белка в мышцах гибернантов во время пробуждения и «зимней» активности [31, 55, 59], не противоречат вышеуказанному предположению.

2. Сезонные изменения содержания титина и небулина в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика

Субстратами кальпаинов являются титин (тайтин/коннектин, мол. м. изоформ составляют 3000–3700 кДа) и небулин (мол. м. 600–900 кДа) — гигантские белки саркомерного цитоскелета поперечнополосатых мышц позвоночных [34]. Титин — белок толстых (миозиновых) нитей. Его молекулы длиной более 1 мкм перекрывают половину саркомера от М-линии до Z-диска, формируя третья филаментную систему в миофибриллах. В А-зоне саркомера титин связан с миозиновыми нитями (эта часть молекулы получила название Т2). В I-зоне саркомера некоторые участки молекулы титина взаимодействуют с тонкими (актиновыми) нитями, однако большая часть его молекулы в этой зоне проходит свободно, формируя эластичное соединение между концами миозиновых нитей и Z-диском (для ссылок см. [51]). На каждую миозиновую нить в половине саркомера приходится по шесть молекул титина, N-концы которых перекрываются в Z-диске, а С-концы — в М-линии саркомера [33]. Титин — полифункциональный белок. Он участвует в поддержании высоко упорядоченной саркомерной структуры [27], запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия

[51]. Как сенсор растяжения и напряжения (эластичный механосенсор) титин, связываясь со многими белками в саркомере и объединяя их в единую сеть (filament network [32]), играет важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации и участвует в регуляции экспрессии мышечных генов и белкового обмена в саркомере [32].

Небулин — белок тонких (актиновых) нитей. Функции этого белка заключаются в стабилизации актиновых нитей, регулировании их длины и поддержании структуры Z-диска саркомера [34, 37]. Результаты недавно проведенных исследований позволили сделать предположение об участии небулина в регуляции мышечного сокращения на уровне отдельных поперечных мостиков миозина [37].

Показано, что снижение содержания изоформ интактного титина-1 (Т1) и небулина в 1,5–2 раза в скелетных мышцах человека и животных после пребывания в условиях гравитационной разгрузки [9, 13, 48, 49, 50, 51] сопровождалось нарушением саркомерной структуры и ухудшением сократительных свойств мышц [13, 48].

На рисунке 2 представлены результаты исследования сезонных изменений содержания небулина и изоформ Т1 в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика. Не было выявлено достоверных различий в содержании небулина в *m. longissimus dorsi* сусликов трех исследуемых групп (см. рис. 2), однако было зарегистрировано снижение (на ≈13%, $p \leq 0,01$) содержания Т1 в исследуемых мышцах сусликов группы «Гипотермия» относительно содержания этих белков в мышцах сусликов группы «Летняя активность» (см. рис. 2).

Известно, что 15%-ное снижение содержания Т1 не сопровождалось нарушениями саркомерной структуры в *m. gastrocnemius* мышцей после 30-суточного космического полета [49]. Учитывая это, можно утверждать, что 13%-ное снижение содержания Т1 в мышцах сусликов при отсутствии снижения содержания небулина не будет сопровождаться негативными изменениями в исследованных мышцах. В поддержку сделанного заключения свидетельствуют данные электронно-микроскопических исследований ультраструктуры поперечнополосатых мышц гибернантов (в том числе и сусликов), не выявившие нарушений упорядоченной структуры миофиламентов в период спячки [7, 8, 12, 44], а также отсутствие значительных нарушений сократительных параметров в мышцах гибернантов, вышедших из состояния гипотермии [30].

Обнаружено также восстановление нормального содержания Т1 в миокарде и *m. longissimus dorsi* сусликов в период «зимней» активности (см. рис. 2).

Эти изменения должны способствовать поддержанию высокоупорядоченной саркомерной структуры и внести вклад в снижение или предотвращение развития мышечной атрофии у гибернантов. Существенную роль в этом процессе должна играть обнаруженная нами гиперактивация кальпаинов (см. рис. 1), запускающих гипертрофический ответ в мышцах гибернантов путем активации Ca^{2+} -кальцинейрин-NFAT сигнального пути, а также участвующих в активации белкового обмена в мышечных клетках в период «зимней» активности.

Следует обратить внимание еще на одну интересную особенность сезонных изменений в содержании гигантских мышечных белков у длиннохвостого суслика, а именно: на снижение содержания протеолитических T2-фрагментов титина в миокарде (в 1,44 раза,

$\rho \leq 0,01$) и *m. longissimus dorsi* (в 2,3 раза, $\rho \leq 0,01$) у животных, пребывающих в состоянии гипотермии (см. рис. 2). Аналогичные изменения зарегистрированы нами ранее в поперечнополосатых мышцах бурого медведя (*Ursus arctos*), пребывающего в состоянии зимнего сна [41]. По-видимому, эти изменения являются общей адаптационной особенностью зимнеящих животных. Уменьшение содержания T2-фрагментов, не содержащих растяжимую I-часть молекулы титина, не должно приводить к нарушению структуры и сократительной функции мышц. Однако дальнейшее протеолитическое расщепление этих фрагментов может иметь важное адаптационное значение, заключающееся в поставке глюкогенных аминокислот для процесса глюконеогенеза в период гибернации.

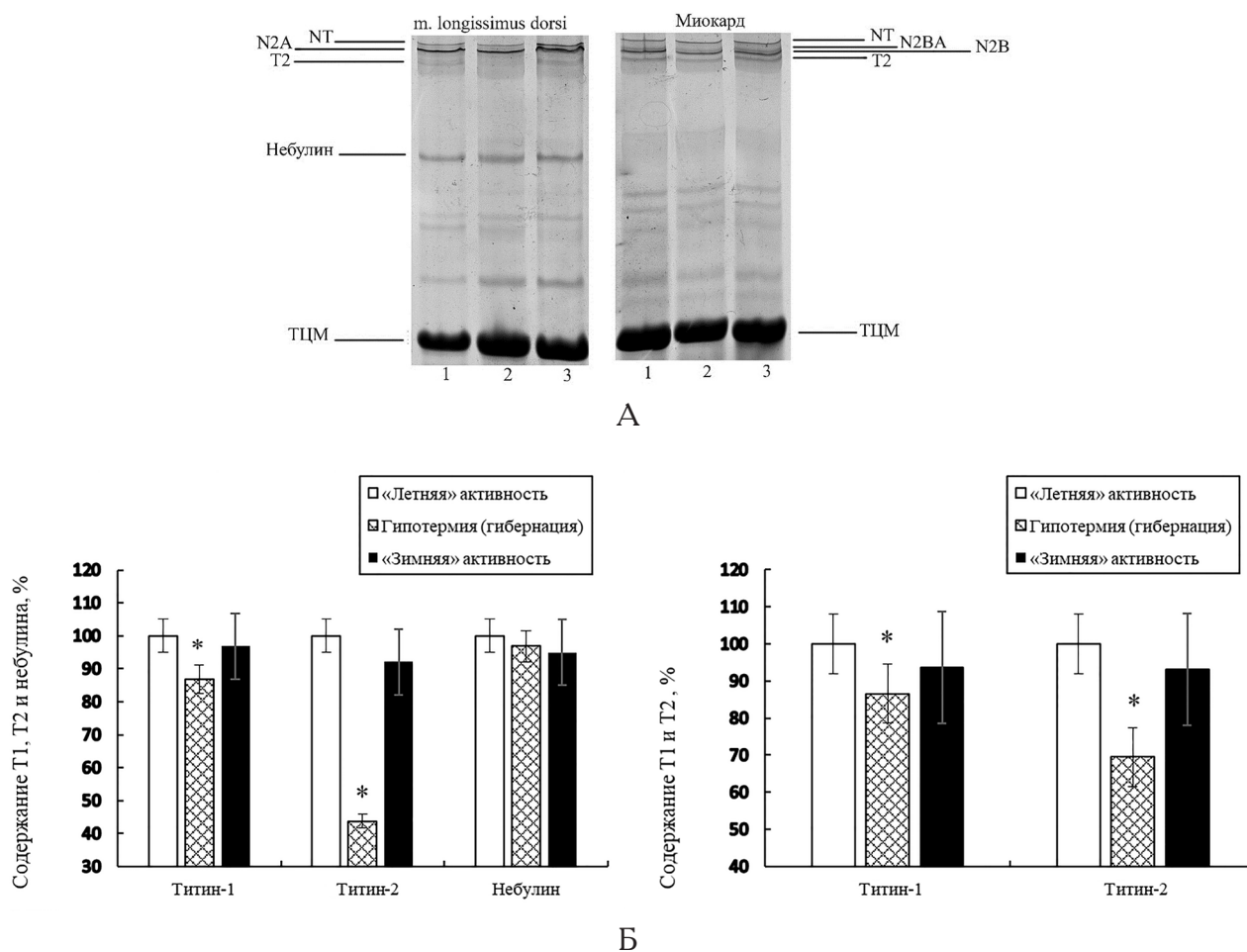


Рис. 2. Сезонные изменения содержания титина и небулина в поперечнополосатых мышцах суслика (*Spermophilus undulatus*). А — Электрофореграммы белков: 1 — «летние» активные суслики (n=5); 2 — спячка (гипотермия) (n=5); 3 — «зимние» активные (n=5). Указаны полосы изоформ интактного титина-1 (NT, N2A, N2BA, N2B), T2-фрагментов титина, небулина, тяжелых цепей миозина. Электрофорез проведен в ПААГ, укрепленном агарозой. Б — диаграммы, показывающие сезонные изменения содержания титина и небулина относительно содержания ТЦМ (данные денситометрии). Слева — *m. longissimus dorsi*, справа — миокард. $M \pm SD$, * $\rho < 0,01$ (в сравнении с группой «летние» активные суслики)

3. Исследование сезонных изменений уровня фосфорилирования титина в поперечнополосатых мышцах длиннохвостого суслика

Известна способность титина к фосфорилированию *in vivo* [43]. Открыты сайты фосфорилирования этого белка, расположенные в разных частях его молекулы от M-линии до Z-диска саркомера [25]. Известно, что фосфорилирование/дефосфорилирование растяжимых участков молекулы сердечного титина, расположенных в I-зоне саркомера, изменяет их жесткость (для ссылок см. статью Линке и Хамдани [32]). Следовательно, фосфорилирование титина сердечной мышцы, как и регулирование экспрессии его коротких (N2B) и длинных (N2BA) изоформ, является частью молекулярного механизма, ответственного за изменение эластичных свойств саркомера, кардиомиоцита и мышцы в целом и адаптирующего сократительный ответ миокарда к действию факторов внутренней или внешней среды. Известна способность к фосфорилированию растяжимых участков I-зоны молекулы титина скелетных мышц [29]. Функциональная роль данной посттрансляционной модификации титина неясна. Фосфорилированию подвергается и T2-фрагмент титина [49], взаимодействующий в саркомере с миозиновыми нитями. Проведенные нами ранее *in vitro* исследования показали, что препараты титина, содержащего больше PO₃-групп, в меньшей степени активировали АТФазную активность актомиозина [1, 2]. Таким образом, изменение

уровня фосфорилирования титина может играть роль в регуляции актин-миозинового взаимодействия.

Известно, что развитие атрофических изменений в мышцах незимнеспящих животных сопровождается не только снижением содержания титина, но и увеличением уровня фосфорилирования этого белка [26, 49]. На основании полученных нами ранее результатов сделано предположение, что гиперфосфорилирование титина приводит к увеличению чувствительности этого белка к протеолизу кальпаинами [11].

На рисунке 3 представлены данные о сезонных изменениях уровня фосфорилирования титина в миокарде и скелетной мышце суслика. Обнаружено достоверное увеличение (в ≈1,6 раза, $p \leq 0,01$) уровня фосфорилирования T1 в *m. longissimus dorsi* животных группы «Гипотермия» по сравнению с этим параметром в мышце «летних» активных сусликов (см. рис. 3). Полученные результаты не противоречат данным *in vitro* исследований, свидетельствующим о повышенном (в 1,5 раза) уровне фосфорилирования титина, выделенного из скелетных мышц сусликов, пребывающих в состоянии гипотермии [2]. Принимая во внимание данные, что гиперфосфорилированный титин в меньшей степени активировал АТФазную активность актомиозина *in vitro* [1, 2], можно предположить, что повышенный уровень фосфорилирования титина скелетных мышц в период спячки будет вносить вклад в ингибирование АТФазной активности миозина и сократительной способности мышцы в целом.

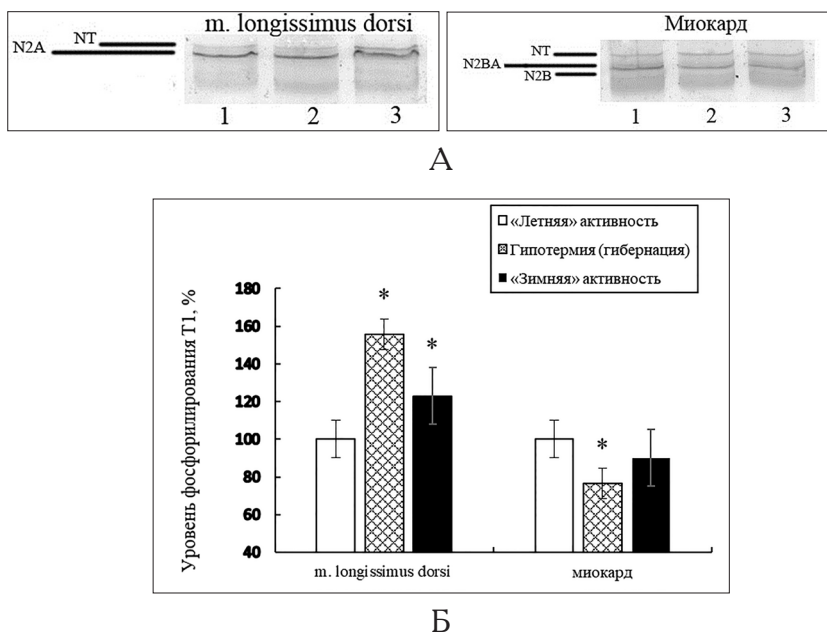


Рис. 3. Сезонные изменения степени фосфорилирования титина в поперечнополосатых мышцах суслика. А — Фосфограммы: 1 — «летние» активные суслики (n=4); 2 — спячка (гипотермия) (n=4); 3 — «зимние» активные (n=4). Б — диаграмма, показывающая сезонные изменения степени фосфорилирования титина. $M \pm SD$, * $p < 0,01$ (в сравнении с группой «летние» активные суслики). *Примечание:* уровень фосфорилирования T2 был незначительный, окраска имела диффузный характер, что не позволило нам провести сравнительные оценки сезонных изменений уровня его фосфорилирования.

В *m. longissimus dorsi* животных группы «Зимняя активность» найдено менее выраженное, но также достоверное увеличение (в $\approx 1,2$ раза, $p \leq 0,01$) уровня фосфорилирования Т1 (см. рис. 3). Если гиперфосфорилирование титина увеличивает его чувствительность к протеолизу [11], то это может способствовать повышенному обороту титина в скелетных мышцах сусликов в период «зимней» активности и восстановлению его нормального содержания, что и наблюдалось в наших экспериментах (см. рис. 2). Полученные результаты согласуются с данными о гиперактивации белкового синтеза в мышцах зимнеящих животных в периоды выхода из состояния гипотермии и кратковременной «зимней» активности [31, 55, 59].

В миокарде животных группы «Гипотермия» обнаружено достоверное снижение уровня фосфорилирования Т1 (на $\approx 23\%$, $p \leq 0,01$), тогда как в группе «Зимняя активность» эти показатели значимо не отличались от таковых в группе «Летняя активность» (см. рис. 3). Известно, что температура сердечной мышцы животных, находящихся в состоянии гипотермии, выше, чем в скелетных мышцах [5]. Вполне вероятно, что гипофосфорилирование титина способствует снижению его чувствительности к протеолизу в миокарде сусликов в период гибернации.

Заключение

По результатам работы можно сделать следующие выводы.

1. Обнаружена гиперактивация *in vitro* кальпаиновых протеаз в белковых экстрактах, полученных из миокарда и *m. longissimus dorsi* сусликов группы «Зимняя активность» (в $\approx 2,4$ и $\approx 1,8$ раза, соответственно, $p \leq 0,01$) и группы «Гипотермия» (в $\approx 2,0$ и $\approx 1,3$ раза, соответственно, $p \leq 0,01$), по сравнению с активностью этих ферментов, выделенных из мышц «летних» активных животных. На основании полученных результатов и литературных данных сделано предположение, что гиперактивация кальпаинов вносит вклад в снижение или предотвращение развития мышечной атрофии у гибернантов путем запуска гипертрофического ответа через активацию Ca^{2+} -кальцинейрин-NFAT сигнального пути, а также через активацию белкового обмена в мышечных клетках в период «зимней» активности.

2. Не выявлено достоверных различий в содержании небулина в *m. longissimus dorsi* сусликов трех исследованных групп, однако зарегистрировано незначительное снижение (на $\approx 13\%$, $p \leq 0,01$) содержания Т1 в миокарде и скелетной мышце сусликов группы «Гипотермия» от-

носительно содержания этих белков в мышцах животных группы «Летняя активность». Достоверных отличий в содержании Т1 в исследованных поперечнополосатых мышцах сусликов из групп «Летняя активность» и «Зимняя активность» не зарегистрировано, что свидетельствует о восстановлении нормального содержания титина в мышцах сусликов во время повторяющихся кратковременных состояний «зимней» активности в течение гибернационного периода. Важная функциональная роль этих изменений заключается в сохранении упорядоченной структуры миофибрилярного аппарата и необходимого уровня сократительной активности мышц в разные периоды физиологической активности животного.

3. Выявлено увеличение (в $\approx 1,6$ раза, $p \leq 0,01$) степени фосфорилирования Т1 в *m. longissimus dorsi* животных группы «Гипотермия» по сравнению с уровнем фосфорилирования этого белка в мышце «летних» активных животных. На основании полученных результатов и литературных данных сделано предположение об ингибирующем влиянии гиперфосфорилирования титина на АТФазную активность миозина и сократительную способность скелетных мышц в период спячки.

4. Показано снижение уровня фосфорилирования титина (на $\approx 23\%$, $p \leq 0,01$) в миокарде сусликов группы «Гипотермия» по сравнению с уровнем фосфорилирования этого белка в мышце «летних» активных животных. Функциональная роль этих изменений может заключаться в повышении устойчивости титина к протеолизу кальпаинами в период гипотермии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00326 с использованием оборудования коллективного пользования ИТЭБ РАН.

Литература

1. Вихлянец И.М., Окунева А.Д., Шпагина М.Д., Шумилина Ю.В., Молочков Н.В., Салмов Н.Н., Подлубная Э.А. Изменения изоформного состава, структуры и функциональных свойств титина сердечной мышцы монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*) после пребывания в условиях реальной невесомости // Биохимия. — 2011. — Т. 76. — С. 1629–1639.
2. Вихлянец И.М., Подлубная Э.А. Фосфорилирование саркомерных цитоскелетных белков — адаптационный фактор ингибирования сократительной активности мышц при зимней спячке // Биофизика. — 2003. — Т. 48. — № 3. — С. 499–504.
3. Гришина Д.А., Супонева Н.А., Шведков В.В., Белопасова А.В. Наследственная прогрессирующая конечностно-

- поясная мышечная дистрофия 2А типа (кальпаинопатия): обзор литературы // Нервно-мышечные болезни. — 2015. — № 1. — С. 25–36.
4. Гублер И.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973. — 144 с.
 5. Захарова Н.М. Некоторые особенности разогрева гибернарующих сусликов *Spermophilus undulatus* при вызванном пробуждении // Фундаментальные исследования. — 2014. — Т. 6. — С. 1401–1405.
 6. Карадулева Е.В., Вихлянцев И.М., Подлубная Э.А. Экспрессия тайтина в миокарде спонтанно-гипертензивных крыс при развитии гипертрофии // Биофизика. — 2010. — Т. 55(4). — С. 612–618.
 7. Клика Э., Зайцова А. Изменения структурных элементов органов у летучих мышей в периоды активности и гибернации // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. — 1984. — Т. 87(9). — С. 47–52.
 8. Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н. Структурные аспекты адаптации зимнеявляющихся животных // Проблемы криобиологии. — 1996. — № 3. — С. 44–51.
 9. Окунева А.Д., Вихлянцев И.М., Шпагина М.Д., Рогачевский В.В., Хуцян С.С., Подлубная Э.А., Григорьев А.И. Изменения изоформного состава тайтина и тяжелых цепей миозина скелетных мышц монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*) после 12-суточного космического полета // Биофизика. — 2012. — Т. 57(5). — С. 756–763.
 10. Попова С.С., Вихлянцев И.М., Захарова Н.М., Подлубная Э.А., Фесенко Е.Е. Сезонные изменения протеолитической активности кальпаинов в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus* // Доклады Академии наук. — 2017. — Т. 472. — № 4. — С. 487–490.
 11. Салмов Н.Н., Грицына Ю.В., Уланова А.Д., Вихлянцев И.М., Подлубная Э.А. О роли фосфорилирования тайтина в развитии мышечной атрофии // Биофизика. — 2015. — Т. 60. — № 4. — С. 829–832.
 12. Хромов А.С., Сребницкая Л.К., Рождественская Э.Е., Орлова А.А., Леднев В.В. Са²⁺-активируемое напряжение, развиваемое одиночными демембранизированными волокнами скелетных мышц суслика (*Citellus undulatus*) в разные фазы гибернации // Механизмы зимней спячки. — Пущино: ОНТИ, 1987. — С. 95–101.
 13. Шенкман Б.С., Подлубная Э.А., Вихлянцев И.М., Литвинова К.С., Удальцов С.Н., Немировская Т.Л., Лемешева Ю.С., Мухина А.М., Козловская И.Б. Сократительные характеристики и белки саркомерного цитоскелета волокон m. soleus человека в условиях гравитационной разгрузки. Роль опорного стимула // Биофизика. — 2004. — Т. 49(5). — С. 881–890.
 14. Anzil A.P., Sancesario G., Massa R., Bernardi G. Myofibrillar disruption in the rabbit soleus muscle after one-week hindlimb suspension // Muscle & Nerve. — 1991. — Vol. 14(4). — P. 358–369.
 15. Baki A., Tompa P., Alexa A., Molnar O., Friedrich P. Autolysis parallels activation of mu-calpain // Biochemistry Journal. — 1996. — Vol. 318. — P. 897–901.
 16. Blaber E., Marçal H., Burns B.P. Bioastronautics: the influence of microgravity on astronaut health // Astrobiology. — 2010. — Vol. 10(5). — P. 463–473.
 17. Borbely A., FalcaoPires I., van Heerebeek L., Hamdani N., Edes I., Gavina C., Leite-Moreira A.F., Bronzwaer J.G., Papp Z., van der Velden J., Stienen G.J., Paulus W.J. Hypophosphorylation of the Stiff N2B-titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium // Circulation Research. — 2009. — Vol. 104(6). — P. 780–786.
 18. Booth F.W., Seider M.J. Recovery of skeletal muscle after 3 mo of hindlimb immobilization in rats // Journal of Applied Physiology. — 1979. — Vol. 47(2). — P. 435–439.
 19. Campbell R.L., Davies P.L. Structure-function relationships in calpains // Biochemistry Journal. — 2012. — Vol. 447. — P. 335–351.
 20. Cazorla O., Freiburg A., Helmes M., Centner T., McNabb M., Wu Y., Trombitas K., Labeit S., Granzier H. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness // Circulation Research. — 2000. — Vol. 86. — P. 59–67.
 21. Cotton C.J. Skeletal muscle mass and composition during mammalian hibernation // Journal of Experimental Biology. — 2016. — Vol. 219(Pt 2). — P. 226–234.
 22. Enns D.L., Raastad T., Ugelstad I., Belcastro A.N. Calpain/calpastatin activities and substrate depletion patterns during hindlimb unweighting and reweighting in skeletal muscle // European Journal of Applied Physiology. — 2007. — Vol. 100. — P. 445–455.
 23. Goll D.E., Netti G., Mares S.W., Thompson V.F. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains // Journal of Animal Science. — 2008. — № 86. — P. 19–35.
 24. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system // Physiological Reviews. — 2003. — Vol. 83. — P. 731–801.
 25. Gregorio C.C., Granzier H., Sorimachi H., Labeit S. Muscle assembly: a titanic achievement // Current Opinion in Cell Biology. — 1999. — Vol. 11. — P. 18–25.
 26. Gritsyna Y.V., Salmov N.N., Bobylev A.G., Ulanova A.D., Kukushkin N.I., Podlubnaya Z.A., Vikhlyantsev I.M. Increased autolysis of mu-calpain in skeletal muscles of chronic alcohol-fed rats // Alcohol Clinical Experimental Research. — 2017. — Vol. 41(10). — P. 1686–1694.
 27. Horowitz R., Kempner E.S., Bisher M.E., Podolsky R.J. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle // Nature. — 1986. — Vol. 323. — P. 160–164.
 28. Hudson N.J., Franklin C.E. Maintaining muscle mass during extended disuse: aestivating frogs as a model species //

- Journal of Experimental Biology. — 2002. — Vol. 205(Pt 15). — P. 2297–2303.
29. Kruger M., Linke W.A. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension // Journal of Muscle Research and Cell Motility. — 2006. — Vol. 27. — P. 435–444.
 30. Lee K., Park J.Y., Yoo W., Gwag T., Lee J.W., Byun M.W., Choi I. Overcoming muscle atrophy in a hibernating mammal despite prolonged disuse in dormancy: Proteomic and molecular assessment // Journal of Cellular Biochemistry. — 2008. — Vol. 104. — P. 642–656.
 31. Lee K., So H., Gwag T., Ju H., Lee J.W., Yamashita M., Choi I. Molecular mechanism underlying muscle mass retention in hibernating bats: Role of periodic arousal // Journal of Cellular Physiology. — 2010. — Vol. 222. — P. 313–319.
 32. Linke W.A., Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin // Circulation Research. — 2014. — Vol. 114. — P. 1052–1068.
 33. Liversage A.D., Holmes D., Knight P.J., Tskhovrebova L., and Trinick J. Titin and the sarcomere symmetry paradox // J. Mol. Biol. — 2001. — Vol. 305. — P. 401–419.
 34. Meyer L.C., Wright N.T. Structure of giant muscle proteins // Frontiers in Physiology. — 2013. — Vol. 4. — P. 1–12.
 35. Mohrhauser D.A., Underwood K.R., Weaver A.D. In vitro degradation of bovine myofibrils is caused by μ -calpain, not caspase-3 // Journal of Animal Science. — 2011. — Vol. 89. — P. 798–808.
 36. Murphy R.M., Verburg E., Lamb G.D. Ca^{2+} -activation of diffusible and bound pools of μ -calpain in rat skeletal muscle // Journal of Physiology. — 2006. — Vol. 576(Pt 2). — P. 595–612.
 37. Ottenheijm C.A., Granzier H., Labeit S. The sarcomeric protein nebulin: another multifunctional giant in charge of muscle strength optimization // Frontiers in Physiology. — 2012. — Vol. 3. — P. 37.
 38. Raser K.J., Posner A., Wang K.K. Casein zymography: a method to study μ -calpain, m-calpain, and their inhibitory agents // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 1995. — Vol. 319(1). — P. 211–216.
 39. Reid W.D., Ng A., Wilton R.K., Milsom W.K. Characteristics of diaphragm muscle fibre types in hibernating squirrels // Respiration Physiology. — 1995. — Vol. 101. — P. 301–309.
 40. Riley D.A., Thompson J.L., Krippendorf B.B., Slocum G.R. Review of spaceflight and hindlimb suspension unloading induced sarcomere damage and repair // Basic Applied Myology. — 1995. — Vol. 5(2). — P. 139–145.
 41. Salmov N.N., Vikhlyantsev I.M., Ulanova A.D., Gritsyna Y.V., Bobylev A.G., Saveljev A.P., Makariushchenko V.V., Maksudov G.Y., Podlubnaya Z.A. Seasonal changes in isoform composition of giant proteins of thick and thin filaments and titin (connectin) phosphorylation level in striated muscles of bears (Ursidae, Mammalia) // Biochemistry. — 2015. — Vol. 80(3). — P. 343–355.
 42. Shenkman B.S., Belova S.P., Lomonosova Y.N., Kostrominova T.Y., Nemirovskaya T.L. Calpain-dependent regulation of the skeletal muscle atrophy following unloading // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 2015. — Vol. 584. — P. 36–41.
 43. Somerville L.L., Wang K. Sarcomere matrix of striated muscle: in vivo phosphorylation of titin and nebulin in mouse diaphragm muscle // Archives of Biochemistry and Biophysics. — 1988. — Vol. 262. — P. 118–129.
 44. Steffen J.M., Li Y., Steele P.S., Klueber K.M., Milsom W.K. Muscle disuse in hibernation: gene expression and morphology / In: Life in the Cold. Ecological, physiological, and molecular mechanisms (edited by Carey C., Florant G., Wunder B., Horwitz B.). — Westview Press, Boulder, San Francisco, Oxford, 1993. — P. 511–518.
 45. Suzuki K. The structure of the calpains and the calpain gene / In: Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis. Mellgren R.L., and Murachi T. (Eds.). — CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990. — P. 25–35.
 46. Tatsumi R., Hattori A. Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin by electrophoresis in 2% polyacrylamide slab gels strengthened with agarose // Analytical Biochemistry. — 1995. — Vol. 224. — P. 28–31.
 47. Tidball J.G., Spencer M.J. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse // Journal of Physiology. — 2002. — Vol. 545. — P. 819–828.
 48. Udaoka J., Ohmori S., Terui T., Ohtsuki I., Ishiwata S., Kurihara S., Fukuda N. Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization // Journal of General Physiology. — 2008. — Vol. 131. — P. 33–41.
 49. Ulanova A., Gritsyna Y., Vikhlyantsev I., Salmov N., Bobylev A., Abdusalamova Z., Rogachevsky V., Shenkman B., Podlubnaya Z. Isoform composition and gene expression of thick and thin filament proteins in striated muscles of mice after 30-day space flight // Biomedical Res. International. — 2015:104735. doi: 10.1155/2015/104735.
 50. Vikhlyantsev I.M., Malyshev S.L., Shenkman B.S., Podlubnaya Z.A. Composition of the titin family proteins in skeletal muscle of ground squirrel during hibernation and rats in simulated microgravity // Biophysics. — 2004. — Vol. 49(6). — P. 895–900.
 51. Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A. New Titin (Connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: Facts and suppositions // Biochemistry. — 2012. — Vol. 77(13). — P. 1515–1535.
 52. Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A. Nuances of electrophoresis study of titin/connectin // Biophysical Reviews. — 2017. — Vol. 9(3). — P. 189–199.
 53. Warren C.M., Jordan M.C., Roos K.P., Krzesinski P.R., Greaser M.L. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium // Cardiovascular Research. — 2003. — Vol. 59. — P. 86–94.

54. Wickler S.J., Hoyt D.F., Vanbreukelen F. Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground-squirrel *Spermophilus lateralis* // *American Journal of Physiology*. – 1991. – Vol. 261. – P. 1214–1217.
55. Wu C.W., Storey K.B. Regulation of the mTOR signaling network in hibernating thirteen-lined ground squirrels // *Journal of Experimental Biology*. – 2012. – Vol. 215. – P. 1720–1727.
56. Wu H.Y., Tomizawa K., Oda Y., Wei F.Y., Lu Y.F., Matsushita M., Li S.T., Moriwaki A., Matsui H. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279(6). – P. 4929–4940.
57. Yang C.X., He Y., Gao Y.F., Wang H.P., Goswami N. Changes in calpains and calpastatin in the soleus muscle of Daurian ground squirrels during hibernation // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2014. – Vol. 176. – P. 26–31.
58. Zhang Y., Storey K.B. Regulation of gene expression by NFAT transcription factors in hibernating ground squirrels is dependent on the cellular environment // *Cell Stress Chaperones*. – 2016. – Vol. 21(5). – P. 883–894.
59. Zhegunov G.F., Mikulinski I.E. [Activation of Protein Synthesis in Tissues of Gophers after Arousal from Hibernation] // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 1987. – Vol. 59(3). – P. 69–73. [Article in Russian].

Список сокращений:

T1 – интактная молекула титина, расположенная от M-линии до Z-диска саркомера;
NT, N2A, N2BA, N2B – изоформы T1;
T2 – протеолитический фрагмент интактного T1, связанный с миофибриллами в A-диске саркомера.

SEASONAL CHANGES OF PROTEOLYTIC ACTIVITY OF CALPAINS AND THE CONTENT OF TITIN AND NEBULIN IN STRIATED MUSCLES OF THE LONG-TAILED GROUND SQUIRRELS (*SPERMOPHILUS UNDULATUS*)

Y.A. YUTSKEVICH¹, S.S. POPOVA², N.N. SALMOV², A.D. ULANOVA^{2,3}, N.M. ZAKHAROVA⁴, I.M. VIKHLYANTSEV^{2,3}

¹*Kuban State University, Krasnodar, Krasnodar Krai;*

²*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,*

³*Pushchino State Institute of Natural Sciences,*

⁴*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region*

The seasonal changes of the proteolytic activity of μ - and m-calpains and the content of giant proteins of the sarcomeric cytoskeleton of titin and nebulin in the myocardium and the skeletal muscle (m. longissimus dorsi) of the long-tailed ground squirrel (*Spermophilus undulatus*) were studied by the methods of casein zymography and SDS gel electrophoresis. Hyperactivation of calpain proteases in protein extracts obtained from the myocardium and the m. longissimus dorsi of the ground squirrels of the «Winter Activity» group (in $\approx 2,4$ and $\approx 1,8$ times, respectively, $p \leq 0,01$) and «Hypothermia» group (in $\approx 2,0$ and $\approx 1,3$ times, respectively, $p \leq 0,01$), compared with the activity of these enzymes in protein extracts from the muscles of «summer» active animals, was recorded. There were no seasonal differences in the content of nebulin in m. longissimus dorsi, but the reduction (by $\approx 13\%$, $p \leq 0,01$) of the titin-1 (T1) content in the myocardium and the skeletal muscle of the ground squirrels of the «Hypothermia» group relative to the content of these proteins in the muscles of the animals of the «Summer Activity» group was recorded. There were no reliable differences in the T1 content in the striated muscles of the ground squirrels of the «Summer Activity» and «Winter Activity» groups, which indicates a restoration of the normal titin content in the muscles of ground squirrels during the period of «winter» activity. Using Pro-Q Diamond staining, an increase (in $\approx 1,6$ times, $p \leq 0,01$) of the level of phosphorylation of T1 in m. longissimus dorsi of the ground squirrels of the group «Hypothermia» compared with the level of phosphorylation of this protein in the muscle of «summer» active animals was observed. On the contrary, in the myocardium of the ground squirrels of the group «Hypothermia» the decrease (by $\approx 23\%$, $p \leq 0,01$) of the level of titin phosphorylation was registered. The role of the above changes in molecular mechanisms that contribute to reducing or preventing the development of atrophic changes in the muscles of hibernating animals is discussed.

Keywords: hibernation, long-tailed ground squirrel *Spermophilus undulatus*, striated muscles, myocardium, titin, nebulin, μ -calpain, m-calpain, phosphorylation.

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА БИНАЗЫ С МУТАЦИЕЙ В ПОТЕНЦИАЛЬНОМ САЙТЕ ДИМЕРИЗАЦИИ БЕЛКА

И.М. ЛИСЕВИЧ, Ф.Г. КУПРИЯНОВА-АШИНА, В.В. УЛЬЯНОВА*

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Димеризация является одним из важных свойств, определяющих функционирование многих белков, в том числе и рибонуклеаз. Димеры рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы) обнаружены как в кристаллах, так и в естественных условиях. Представления о способах их образования противоречивы. В данной статье описано получение генетической конструкции, несущей ген биназы с мутацией R15A, для последующего выделения белка и его физико-химического анализа с целью выяснения фундаментальных механизмов, лежащих в основе димеризации биназы.

Ключевые слова: рибонуклеаза, РНКазы, биназа, димеризация, сайт-направленный мутагенез.

Введение

На протяжении многих лет рибонуклеазы (РНКазы) не перестают обращать на себя внимание исследователей в связи с их биологическими свойствами. Спектр действия данных ферментов, помимо участия в метаболизме различных видов РНК и регуляции экспрессии генов, включает в себя избирательную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам [9]. Полагают, что механизм цитотоксического действия многих РНКаз обусловлен не столько их каталитической активностью, сколько электростатическим неспецифичным связыванием фермента с поверхностными гликолипидами и специфичным взаимодействием с онкопротеинами сигнальных путей, следствием чего является апоптоз [4, 8].

Для эукариотических рибонуклеаз — РНКазы BS [3] и РНКазы А [5] — была показана способность димеризоваться, при этом в случае РНКазы BS у димерной формы повышалась цитотоксичность за счет ее устойчивости к действию ингибитора РНКаз (ИР) [7]. Прокариотические РНКазы, представителем которых является биназа *Bacillus pumilus*, не подвержены действию ИР; поэтому их использование в качестве

противоопухолевых агентов более перспективно. Ранее считалось, что мономер является основной формой биназы [6], хотя димеры были зарегистрированы в кристаллах [10, 11]. Недавно они были обнаружены и в культуральной жидкости бацилл [1], причем было показано, что в нативных условиях димеры преобладают над мономерной формой даже в слабо концентрированных растворах. Предполагается, что способ образования димеров биназы в естественных условиях, в отличие от кристаллов, оставляет оба каталитических центра в димере открытыми. В пользу открытых центров свидетельствует большая РНКазная активность димера по сравнению с мономером [1] и результаты теоретических расчетов способов ассоциации мономеров биназы в растворе, согласно которым, наиболее высокая константа скорости ассоциации димеров характерна именно для модели с двумя открытыми активными центрами [2]. Таким образом, накопленные экспериментальные данные подвели к необходимости детального исследования механизмов образования димеров у биназы.

Целью настоящей работы стало создание генетической конструкции, несущей ген биназы с мутацией в потенциальном сайте димеризации, для выделения белка и изучения его физико-химических свойств и биологических эффектов.

Материалы и методы

Чтобы проверить гипотезу о двух открытых активных центрах при димеризации биназы в растворе, нами за основу была взята модель димеров I типа, предложенная

© 2018 г. Лисевич И.М., Куприянова-Ашина Ф.Г., Ульянова В.В.

* Автор для переписки:

Ульянова Вера Владимировна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник OpenLab «Маркеры патогенеза», ассистент кафедры микробиологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: vera.uljanova@kpfu.ru

Е.А. Ермаковой [2]. Согласно этой модели, одним из аминокислотных остатков, потенциально участвующих в димеризации, является Arg15. Он был выбран нами в качестве мишени для последующей модификации, так как образует немалое число контактов, обеспечивающих наибольшую энергетическую стабильность димеров.

Результаты

Аргинин является диаминомонокарбоновой положительно заряженной аминокислотой, что обуславливает его способность к образованию ионных связей, а также

солевых мостиков, в том числе межсубъединичных. Чтобы выяснить, является ли ключевой роль Arg15 в димеризации биназы в естественных условиях, было принято решение заменить его на нейтральный аланин, не нарушающий конформацию основной цепи и не вносящий электростатических и стерических эффектов. Мутацию в ген биназы вносили методом обратной ПЦР с использованием набора реактивов «Q5 Site-directed mutagenesis kit» («NEB», Великобритания). В качестве ДНК-матрицы была использована плаزمида pML5, несущая ген биназы под собственным промотором, а также ген внутриклеточного ингибитора барстара (рис. 1).

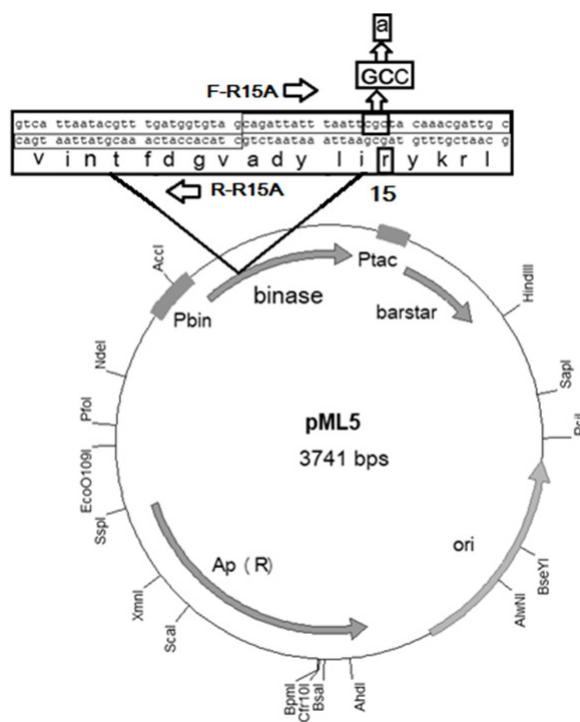


Рис. 1. Расположение прямого (F-R15A) и обратного (R-R15A) праймеров на плазмиде pML5, использованной в качестве ДНК матрицы для обратной ПЦР, в ходе которой была внесена мутация R15A в ген биназы

Прямой праймер F-R15A (5'-CAGATТАТТТАА ТТGCСТАСАААСГАТТGC--3') был сконструирован на основе кодирующей цепи гена биназы и включал по середине замену триплета CGC, кодирующего аргинин, на GCC, кодирующий аланин. Обратный праймер R-R15A (5'-СТАСАССАТСАААСГАТТАТТАТГАС-3') был подобран на основе матричной цепи и не содержал замен. Праймеры были сконструированы «хвост к хвосту» (см. рис. 1), что позволило амплифицировать всю плазмиду целиком (рис. 2).

Для оптимизации температуры отжига праймеров в ПЦР использовали градиент температуры (56, 58 и

60 °C). В результате успешная амплификация прошла во всех образцах, и были получены фрагменты ДНК размером около 4 тыс. п.о. (см. рис. 2). Затем для удаления ДНК-матрицы ПЦР-продукты обрабатывали DpnI рестриктазой, которая расщепляет только метилированную ДНК. Так как плазмида pML5 была выделена из клеток *Escherichia coli*, она метилирована и поэтому гидролизуетсся данной рестриктазой с образованием нескольких фрагментов, которые были удалены в ходе последующей очистки. Далее линейные ПЦР-продукты фосфорилировали по 5'-концам и лигировали. Полученными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli*

DN5α. Из колоний, отобранных на среде с ампициллином (селективным маркером плазмиды ρML5), выделяли плазмидную ДНК. Затем проводили ПЦР с использованием праймеров F-NcoI и R-Bpu [12], позволяющих амплифицировать участок около 700 п.о., содержащий гены биназы и барстара. Для подтверждения наличия замены Arg15Ala в гене биназы данный фрагмент был секвенирован по Сенгеру в обоих направлениях. Контиги выравнивали и сравнивали с нативным геном биназы. В результате было установлено, что большинство плазмид содержало искомую замену.

Чтобы добиться гиперэкспрессии, мутантный ген биназы был переклонирован с плазмиды ρML5-R15A в вектор рЕТ2615 под контроль сильного промотора T7 [12] (рис. 3А).

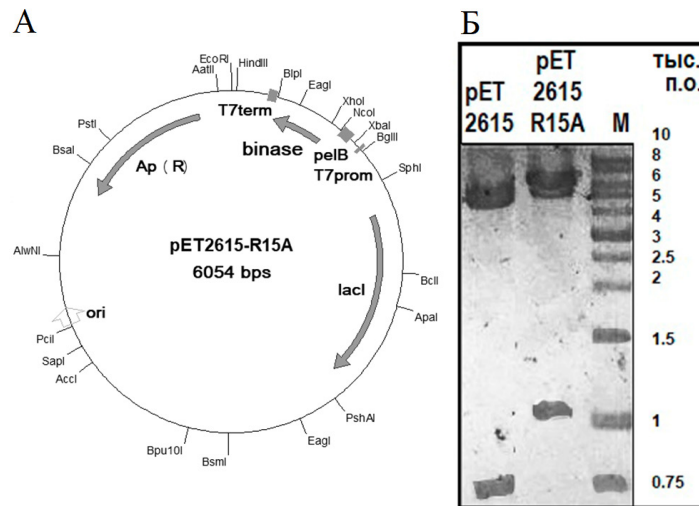


Рис. 3. Плазмида ρET2615-R15A, сконструированная на основе вектора ρET2615 для экспрессии мутантного гена биназы в клетках *Escherichia coli* BL21 λDE3: А — схема плазмиды ρET2615-R15A; Б — рестрикционный анализ плазмид ρET2615 и ρET2615-R15A с использованием эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *SphI*. М — маркер длин ДНК («1 kb DNA Ladder», Евроген)

Для этого методом ПЦР был амплифицирован ген биназы с использованием праймеров F-*XhoI* (5'-CAGTCGctcgagGCCGTCATTAATACGTTTG-3') и R-*BlnI* (5'-TAGATTgctcagcTTATCGAATACGTGTGAAAG-3'), содержащих сайты рестрикции для эндонуклеаз *XhoI* и *BlnI* соответственно. Далее проводили рестрикцию ПЦР-продукта и вектора ρET2615 рестриктазами *XhoI* («Fermentas», США) и *BlnI* («СибЭнзим», РФ), их очистку и лигирование при шестикратном молярном избытке вставки. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* JM109 и отбирали клоны, несущие искомую генетическую конструкцию. Из клонов выделяли плазмидную ДНК, которую подвергали рестрикционному анализу для подтверждения наличия вставки

в полученной конструкции. Для этого были выбраны рестриктазы *EcoRI* и *SphI* («СибЭнзим», РФ). При обработке ими вектора ρET2615 и полученной плазмиды ρET2615-R15A, несущей мутантный ген биназы, были получены фрагменты разной длины, хорошо различимые на электрофореграмме: около 5 тыс п.о. и 750 п.о. в первом случае и примерно 5 тыс п.о. и 1000 п.о. — во втором (рис. 3Б). Эти результаты полностью соответствовали данным *in silico* рестрикции с ожидаемыми фрагментами 5015 п.о. и 760 п.о., а также 5015 п.о. и 1039 п.о. соответственно. Исходя из размера образовавшихся фрагментов, можно заключить, что вставка в плазмиде присутствует (см. рис. 3Б). Дополнительно наличие вставки в полученной плазмиде было подтверждено методом ПЦР.

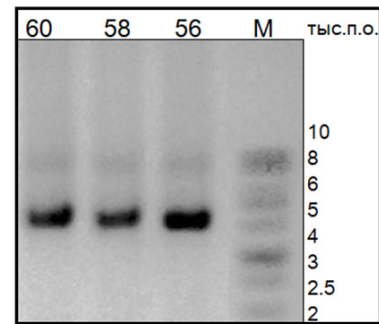


Рис. 2. Электрофорез ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймеров F-R15A и R-R15A и плазмиды ρML5 (3741 п.о.) в качестве ДНК матрицы. М — маркер длин ДНК («1 kb DNA Ladder», Евроген), 56, 58, 60 — температуры отжига праймеров в ПЦР, °С

Заключение

Таким образом, была получена экспрессионная конструкция, несущая ген биназы с мутацией в потенциальном сайте димеризации Arg15Ala под контролем ИПТГ-индуцируемого промотора T7. Она будет использована для наработки и очистки мутантного белка для последующего изучения его биохимических и структурных особенностей и экспериментального обоснования теоретически построенной модели [2]. Помимо этого, будут оценены важность димеризации в проявлении биназой цитотоксических свойств в отношении опухолевых и вирус-зараженных клеток, а также ее функциональная значимость для бактериальной популяции.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, и поддержана РФФИ (проект No 14-14-00522).

Литература

1. *Dudkina E., Kayumov A., Ulyanova V. et al.* New insights into secreted ribonuclease structure: binase is a natural dimer // *PloS One.* – 2014. – Vol. 9(12). – P. e115818. doi:10.1371/journal.pone.0115818.
2. *Ermaikova E.* Brownian dynamics simulation of competitive reactions: binase dimerization and the association of binase and barstar // *Biophysical Chemistry.* – 2007. – Vol. 130. – P. 26–31.
3. *Gotte G., Mahmoud Helmy A., Ercole C. et al.* Double domain swapping in bovine seminal RNase: formation of distinct N- and C-swapped tetramers and multimers with increasing biological activities // *PloS One.* – 2012 – Vol. 7(10). e46804. doi: 10.1371/journal.pone.0046804.
4. *Ilinskaya O., Singh I., Dudkina E. et al.* Direct inhibition of KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase) // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2016. – Vol. 1863. – P. 1559–1567.
5. *Liu Y., Gotte G., Libonati M. et al.* A domain – swapped RNase A dimer with implications for amyloid formation // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 211–214.
6. *Makarov A., Protasevich L., Kuznetsova N. et al.* Comparative study of thermostability and structure of close homologues – barnase and binase // *J. of Biomolecular Structure & Dynamics.* – 1993. – Vol. 10(6). – P. 1047–1065.
7. *Merlino A., Ercole C., Picone D. et al.* The buried diversity of bovine seminal ribonuclease: Shape and cytotoxicity of the swapped non-covalent form of the enzyme // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 376. – P. 427–437.
8. *Mitkevich V., Burnysheva K., Ilinskaya O.* Cytotoxicity of RNase Sa to the acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells depends on the net charge // *Oncoscience.* – 2014. – Vol. 1(11). – P. 738–744.
9. *Mitkevich V., Ilinskaya O., Makarov A.* Antitumor RNases: killer's secrets // *Cell Cycle.* – 2015. – Vol. 14. – P. 931–932.
10. *Mitkevich V., Schulga A., Trofimov A. et al.* Structure and functional studies of the ribonuclease binase Glu43Ala/Phe81Ala mutant // *Biological Crystallography.* – 2013. – Vol. 69. – P. 991–996.
11. *Polyakov K., Lebedev A., Okorokov A. et al.* The structure of substrate-free microbial ribonuclease binase and of its complexes with 3'GMP and sulfate ions // *Biological Crystallography.* – 2002. – Vol. 58. – P. 744–750.
12. *Ulyanova V., Shah Mahmud R., Klug G.* A set of genetic constructs for binase and barstar overproduction // *BioNanoSci.* – 2017. – Vol. 7(1). – P. 222–225.

PLASMID CONSTRUCTION FOR EXPRESSION OF BINASE GENE MUTATED IN PROPOSED PROTEIN DIMERIZATION SITE

I.M. LISEVICH, F.G. KUPRIYANOVA-ASHINA, V.V. ULYANOVA

Kazan (Volga-Region) Federal University

Dimerization plays an important role in functioning of many proteins including ribonucleases. Dimers of *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase) were detected both in crystals and under natural conditions. However, there are still some contradictory views on mode of their formation. This article describes the creation of genetic construction carrying R15A mutant binase gene for further protein extraction and purification as well as analysis of physical and chemical properties of the mutant binase in order to reveal fundamental mechanisms underlying binase dimerization.

Keywords: ribonuclease, RNase, binase, dimerization, site-directed mutagenesis.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* И РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОБЕГОВ ИЗ ЭКСПЛАНТОВ ЭПИКОТИЛЕЙ АМАРАНТА *AMARANTHUS CRUENTUS*

Р.М. ТАИПОВА^{1*}, Б.Р. КУЛУЕВ^{1,2}

¹Башкирский государственный университет,

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа

Амарант является перспективной для России сельскохозяйственной культурой. Поэтому представляется актуальной разработка способов выращивания этого растения в условиях *in vitro* и регенерации побегов из эксплантов. Эти методы могут быть использованы как для микроклонального размножения ценных линий амаранта, так и при генетической трансформации этого растения. В данной статье описаны результаты по введению в культуру *in vitro* и микроклональному размножению амаранта багряного *Amaranthus cruentus* из эксплантов эпикотилей. Стерилизацию семян амаранта осуществляли с помощью 70% этилового спирта и 20% белизны. Регенерации побегов удалось добиться из сегментов эпикотилей на питательной среде Мурасиге — Скуга, содержащей 13 мкМ 6-бензиламинопурина и 1 мкМ нафтилуксусной кислоты. Регенерировавшие побеги укоренялись на среде МС с добавлением 2 мкМ индолилуксусной кислоты.

Ключевые слова: *Amaranthus cruentus*, культура *in vitro*, регенерация, эпикотиль, укоренение.

Введение

Амарант является ценным культурным растением, имеющим перспективы для широкого его применения в качестве овощной, кормовой, зерновой, лекарственной и декоративной культуры. Высокая питательная ценность, обусловленная повышенным содержанием белка, сбалансированного по аминокислотному составу, витаминам и минеральным солям, дает возможность использования амаранта в кулинарии, медицине и сельском хозяйстве (Терентьева, 2003 [5]; Магомедов, Чиркова, 2015 [3]). В результате работы отечественных селекционеров было выведено множество новых сортов амаранта с улучшенными ростовыми характеристиками и другими хозяйственно ценными признаками (Жужукин, Шор, 2009 [1]; Таипова, 2015 [4]). Однако для увеличения продуктивности и урожайности амаранта могут быть использованы также методы биотехнологии и генной инженерии. Методы генетической трансформации амаранта *in planta* весьма малоэффективны (Munusamy et al., 2013 [7]; Кулуев и др., 2016 [2]), поэтому представляет большой интерес разработка

способов генетической трансформации этого растения в условиях *in vitro*. Имеются сведения о применении агробактериальной трансформации эмбрионного каллуса *Amaranthus hypochondriacus* (Jofre-Garfias et al., 1997) [6] и сегментов эпикотилей *Amaranthus tricolor* (Pal et al., 2013) [8] для создания трансгенных растений этой культуры. Тем не менее методы регенерации побегов из недифференцированных клеток для других культурных видов и сортов амаранта остаются неразработанными. В связи с этим целью нашей работы была разработка методов введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения амаранта багряного *Amaranthus cruentus*.

Материалы и методы

Для опытов по изучению регенерации побегов у растений амаранта *in vitro* использовали семена *A. cruentus*, которые были предварительно обработаны растворами стерилизующих агентов. Стерилизацию осуществляли по методике, включающей в себя последовательные этапы обработки семян с помощью 70% этилового спирта (1 мин) и 20% белизны (8 мин), которые затем промывали стерильной дистиллированной водой 5–6 раз. Для работы использовалась белизна ООО «Башбытпром» (Стерлитамак, Россия), представляющая собой 15% раствор гипохлорита натрия. После этапа стерилизации семена амаранта рассеивали на среду, содержащую половину солей Мурасиге — Скуга (МС), витамины Гамборга и 30 г/л сахарозы. Семена

© 2018 г. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р.

* Автор для переписки:

Таипова Рагида Мухтаровна

магистрант биологического факультета Башкирского государственного университета

E-mail: Taipova.Ragida@yandex.ru

проращивали при температуре 27 ± 1 °С при интенсивности света 35 мкмоль на кв. м в сек.

Из семидневных проростков в стерильных условиях вырезали сегменты эпикотилей, гипокотилей и листовых дисков (семядоли) длиной 1–2 см. Экспланты культивировали на среде МС, содержащей 13 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 1 мкМ нафтилукусусной кислоты (НУК). Укоренение регенерантов проводили на среде МС с добавлением 2 мкМ индолилукусусной кислоты (ИУК).

Результаты и обсуждение

В настоящей работе для введения в культуру *in vitro* были использованы семена *A. cruentus*, прошедшие стерилизацию по вышеописанной методике с помощью этилового спирта и белизны. При выбранной технологии стерилизации было возможно получение около 80% семян, свободных от микроорганизмов. При этом не было зафиксировано уменьшение всхожести семян по сравнению с контролем (посев без стерилизации на чашку Петри с фильтровальной бумагой). В ходе предварительных работ оптимальной для роста семян была выбрана среда, содержащая половину солей МС, витамины Гамборга и 30 г/л сахаразы. Семена проращивали при температуре 27 ± 1 °С при интенсивности света 35 мкмоль на кв. м в сек. и наблюдали их прорастание через 2 дня (рис. 1А).



Рис. 1. Введение в культуру *in vitro* и регенерация побегов амаранта из эксплантов эпикотилей: А — проростки *A. cruentus* в культуре *in vitro*; Б, В — регенерация побегов из эксплантов эпикотилей и образование каллуса на сегментах гипокотилей на среде МС, содержащей фитогормоны БАП и НУК; Г — укоренение побегов амаранта *in vitro*

Проростки амаранта выращивали в течение десяти дней до появления эпикотилей. Экспланты из листовых дисков, сегментов эпикотилей и гипокотилей культивировали на регенерационной среде с добавлением БАП и НУК в течение пяти дней. За это время происходило увеличение размеров исходных эксплантов, по-видимому, благодаря наличию в среде фитогормонов, ответственных за нормализацию процессов роста.

В результате проведенных нами работ отмечено, что для *A. cruentus* регенерация побега наилучшим образом происходит из сегментов эпикотилей на среде МС с концентрациями фитогормонов: БАП — 13 мкМ и НУК — 1 мкМ (рис. 1Б, В), а экспланты из листьев в процессе культивирования погибали. На сегментах гипокотилей образовывался каллус, но регенерации побегов при этом не происходило (рис. 1Б). В результате работы из пяти эксплантов эпикотилей удалось получить 14 побегов амаранта.

Укоренение полученных побегов проводили также на среде МС, содержащей 2 мкМ ИУК (рис. 1Г). В ходе работы все 14 побегов амаранта удалось укоренить. Далее десять укоренившихся побегов были использованы для оптимизации методов акклиматизации растений к условиям почвы и открытого воздуха. Для этого переносили амаранты в вегетационные сосуды объемом 450 мл, заполненные увлажненным универсальным грунтом Terra vita (Россия). Сверху растения накрывали прозрачными пластиковыми сосудами и выращивали растения в условиях отсутствия дополнительного освещения при комнатной температуре. Через неделю прозрачные пластиковые сосуды убрали и переносили растения в обычные условия световой комнаты (при температуре 27 ± 1 °С и интенсивности света 35 мкмоль на кв. м в сек.). В результате проведенной работы из 10 растений *in vitro* были успешно акклиматизированы к условиям почвы 8.

Заключение

Таким образом, для введения в культуру *in vitro* амаранта багряного может быть использована стандартная методика последовательного погружения семян в 70% этиловый спирт и 20% белизну. Для микрочлонального размножения амаранта больше всего подходят сегменты эпикотилей. При этом может быть использована стандартная среда МС с добавлением БАП и НУК. Регенерировавшие побеги амаранта достаточно легко укореняются на среде с добавлением ИУК. Акклиматизация растений *in vitro* также не представляет

особых трудностей, по крайней мере, при соблюдении стандартных процедур.

Нами отработан метод регенерации побегов амаранта багряного из эксплантов эпикотилей в условиях *in vitro*. Данная технология может быть использована при агробактериальной трансформации амаранта с целью создания его трансгенных форм.

Литература

1. Жужукин В.И., Шор М.Ф. Изменчивость содержания питательных веществ при интродукции амаранта в Нижнем Поволжье // Кормопроизводство. — 2010. — № 11. — С. 28–31.
2. Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Таипова Р.М., Чемерис А.В. Изменение фенотипа трансгенных растений амаранта *Amaranthus retroflexus* L. с конститутивной экспрессией гена ARGOS-LIKE // Генетика. — 2016. — Т. 52. — № 12. — С. 1388–1397.
3. Магомедов И.М., Чиркова Т.В. Амарант — прошлое, настоящее, будущее // Успехи современного естествознания. — 2015. — № 1. — С. 1108–1113.
4. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Амарант: особенности культуры, применение, перспективы возделывания в России и

создания трансгенных отечественных сортов // Биомика. — 2015. — Т. 7. — № 4. — С. 284–299.

5. Терентьева Е. Амарант — растение прошлого и будущего // В мире растений. — 2003. — № 10. — С. 28.
6. Jofre-Garfias A.E., Villegas-Sepúlveda N., Cabrera-Ponce J.L. Agrobacterium-mediated transformation of *Amaranthus shypochochondriacus*: light- and tissue-specific expression of a pea chlorophyll a/b-binding protein promoter // Plant Cell Reports. — 1997. — Vol. 16. — P. 847–852.
7. Munusamy U., Abdullah S.A., Aziz M.A., Khazaai H. Female reproductive system of *Amaranthus* as the target for Agrobacterium-mediated transformation // Advances in Bioscience and Biotechnology. — 2013. — Vol. 4. — P. 188–192.
8. Pal A., Swain S.S., Das A.B. Stable germ line transformation of a leafy vegetable crop amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. — 2013. — Vol. 49. — P. 114–128.

Список сокращений:

БАП — 6-бензиламинопурин,
НУК — нафтилуксусная кислота,
ИУК — индолилуксусная кислота,
МС — среда Мурасиге — Скуга.

INTRODUCTION TO *IN VITRO* CULTURE AND REGENERATION OF SHOOTS FROM EPICOTYL EXPLANTS OF *AMARANTHUS CRUENTUS*

R.M. ТАИПОВА¹, B.R. KULUEV^{1,2}

¹Bashkir State University,

²Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center of RAS, Ufa

Amaranth is a promising agricultural crop for Russia. Priorities in the development and regeneration of shoots from explants. These methods can be used both for microclonal propagation of valuable amaranth lines and for the genetic transformation of this plant. This article presents the results of the introduction into the culture *in vitro* and microclonal propagation of red amaranth *Amaranthus cruentus* from epicotyl explants. Sterilization of seeds of amaranth was carried out with 70% ethyl alcohol and 20% bleach. Regenerations were defeated from epicotyl segments on the Murashige and Skoog (MS) medium, 13 μ M of 6-benzylaminopurine and 1 μ M of naphthylacetic acid were stored. Regenerated shoots are rooted in the MS medium with the addition of 2 μ M indoleacetic acid.

Keywords: *Amaranthus cruentus*, *in vitro* culture, regeneration, epicotyl, rooting.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ЕДИНИЧНЫХ НЕЙРОНОВ СТАТОЦИСТОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

А.А. ОСИПОВ*, Н.А. АСЕЕВ, Е.А. ЧЕСНОКОВА, М.В. РОЩИН,
П.М. КОЛОСОВ, Н.В. БАЛЬ, П.М. БАЛАБАН

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

В данной работе проведен анализ дифференциальной экспрессии генов из сборки *de novo* тотального транскриптома рецепторных волосковых клеток — нейронов статоцистов, органов равновесия виноградной улитки *Helix lucorum*, находившихся под воздействием микрогравитации, в сравнении с контролем. Сравнение проводилось для разных параметров сборки транскриптома и готовой сборки транскриптома тотальной нервной системы. Выявлено изменение экспрессии у 20–40% генов (повышена примерно у 70%) в зависимости от сборки. При сравнении с тотальной нервной системой дифференциальной экспрессии не выявлено.

Ключевые слова: статоцисты, транскриптом, дифференциальная экспрессия, микрогравитация, виноградная улитка, *Helix lucorum*.

Введение

Виноградная улитка *Helix lucorum* является классическим модельным объектом, в том числе для исследования функций нервной системы (см., например, [3, 5]). Однако ее изучение на современном биохимическом, молекулярно-биологическом и генетическом уровне ограничено из-за отсутствия секвенированного генома. Попытки такого секвенирования предпринимались ранее, но встретили значительные трудности, что ставит вопрос о замещении недостающих данных другими методами. Одним из подходов на этом пути является создание сборок транскриптомов конкретных органов, тканей и групп клеток [12, 13]. Это значительно легче осуществить технически и позволяет получить дополнительные данные о путях и способах построения отдельных систем организма из единого плана, заложенного в общем геноме, а также проводить функциональный анализ их сигнальных и биохимических систем [16].

В настоящей работе проведен анализ дифференциальной экспрессии генов рецепторных волосковых клеток — нейронов статоцистов, органов равновесия виноградной улитки *Helix lucorum*, находившихся под

воздействием микрогравитации, то есть в условиях космического полета, в сравнении с контрольными улитками, оставшимися на Земле [2]. Индивидуальным образцом в данном исследовании являлась тотальная мРНК всего из 13 клеток, что сближает с так называемой «транскриптомикой единичных клеток» [11]. Предлагаемый анализ основан на сборках транскриптома *de novo*, проведенных авторским коллективом ранее [1].

Материалы и методы

Для секвенирования были использованы виноградные улитки *Helix lucorum* после 30-суточной экспозиции в условиях микрогравитации на космическом аппарате биологического назначения Бион-М1 (n=4) и контрольная группа (n=4), оставшаяся на Земле при идентичных климатических условиях. Статоцисты улиток препарировали и выделяли содержащиеся в них рецепторные волосковые клетки (13 нейронов из каждого органа). Использовалась тотальная мРНК из этих нейронов.

Секвенирование проводилось на комплексе Ion Proton от Thermo Fisher Scientific Inc. Сырые данные чтений транскриптома после автоматической первичной обработки были получены с помощью системы Torrent Suite Software.

Дальнейшая обработка данных осуществлялась на персональном компьютере с процессором Intel Core i7-3820 (4 ядра, 8 потоков) и 64 ГБ оперативной памяти под управлением операционной системы Debian GNU/Linux 7.0 Wheezy (3.2.0-4-amd64).

© 2018 г. Осипов А.А., Асеев Н.А., Чеснокова Е.А., Рошин М.В., Колосов П.М., Баль Н.В., Балабан П.М.

* **Автор для переписки:**

Осипов Александр Александрович

к.б.н., ст.н.с.,

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

E-mail: aosypov@gmail.com

Сборка транскриптома производилась программой rnaSPAdes [4] с параметрами по умолчанию или с добавлением опции командной строки «Анализ единичной клетки» или с добавлением опции «Опирайтесь на готовую сборку» с использованием предоставленной коллегами (неопубликованной) сборки тотального транскриптома нервной системы. Альтернативная сборка производилась программой Trinity [6, 8]. Параметры сборок оценивались программой QUAST [7]. Для дальнейшего картирования сборки индексировались программой Bowtie [10]. Картирование чтений индивидуальных образцов на общую сборку производилось программой TopHat [9].

Последовательность действий и использованные параметры подробно описаны ранее [1].

Анализ дифференциальной экспрессии проводился с помощью программы Cuffdiff из пакета Cufflinks [15] (типичная строка запуска: ~\$ /tools/cufflinks-2.2.1.Linux_x86_64/cuffdiff -o /data/diff_data -L co,sp -p 8 -u /data/merged_data/merged.gtf /data/mapped_data/co1/accepted_hits.bam,/data/mapped_data/co2/accepted_hits.bam,/data/mapped_data/co3/accepted_hits.bam,/data/mapped_data/co4/accepted_hits.bam /data/mapped_data/sp1/accepted_hits.bam,/data/mapped_data/sp2/accepted_hits.bam,/data/mapped_data/sp3/accepted_hits.bam,/data/mapped_data/sp4/accepted_hits.bam).

Результаты и обсуждение

Как было указано ранее [1], «анализ исходных сырых данных по индивидуальным чтениям конкретных образцов выявил проблемность изучаемого объекта для доступного технического вооружения, подкрепляя ранее встреченные трудности на пути секвенирования целого генома. В частности, это касается, по-видимому, использования для секвенирования данного полного транскриптома платформы Ion Proton, которая дала относительно невысокий процент качественных чтений. Возможно, использование значительно более дорогостоящего или даже еще неразработанного оборудования поможет решить эту проблему в будущем».

Характеристики полученных сборок и средний процент картированных на них генов для опытной и контрольной групп приведены в таблице 1. Использование опций «Анализ единичной клетки» и «Опирайтесь на готовую сборку» программы rnaSPAdes улучшило параметры сборок. Еще более улучшило эти параметры (однако, по-видимому, за счет излишнего мельчения) применение программы Trinity.

Таблица 1

Характеристики полученных сборок и средний процент картированных на них генов для опытной и контрольной групп

Сборка	ass	sc	sc+НС	Trinity	НС
всего контигов	59273	59308	58142	248182	2065601
контигов ≥ 1000 п.о.	5162	5165	5694	4813	32349
общая длина	32118642	32130804	32323607	93622478	338447864
длина ≥ 1000 п.о.	6973004	6974353	8077421	6500058	57218292
максимальный контиг	4575	4575	8758	5230	15939
GC (%)	41,78	41,78	41,83	41,64	41,05
N50	614	614	636	371	222
N75	432	432	438	283	100
L50	17007	17013	16007	82100	306406
L75	32726	32736	31479	154857	913587
N на 100 тыс. п.о.	1,24	1,24	1,24	0,00	0,00
средний % картирования	49,7625	49,775	52,2	61,1375	41,5375
% опыт	44,625	44,65	46,325	57,025	33,625
% контроль	54,9	54,9	58,075	65,25	49,45

Примечание: ass — сборка программой RNASpades с настройками по умолчанию; sc — сборка программой RNASpades с использованием опции командной строки «Анализ единичной клетки»; sc+НС — сборка программой RNASpades с использованием опции командной строки «Анализ единичной клетки» при добавлении опции «Опирайтесь на готовую сборку», в данном случае — тотального транскриптома нервной системы; Trinity — сборка программой Trinity; НС — сборка тотального транскриптома нервной системы. Средний процент чтений индивидуальных образцов, картированных на разные варианты сборки, приведен в нижних строчках, соответственно — общий и отдельно по группам опытных и контрольных образцов

Картирование индивидуальных чтений образцов выявило увеличение процента покрытия при использовании программы RNASpades с настройками по умолчанию (среднее покрытие — 49,7625%, опыта — 44,625%, контроля — 54,9%), затем — с использованием опции командной строки «Анализ единичной клетки» (среднее покрытие — 49,775%, опыта — 44,65%, контроля — 54,9%), еще более — при добавлении опции «Опирайтесь на готовую сборку» (среднее покрытие — 46,325%, опыта — 44,65%, контроля — 54,9%). Наконец, максимальный процент покрытия со значительным отрывом (61,1375, 57,025, 65,25%) был достигнут при использовании программы Trinity с единственно доступными настройками по умолчанию.

Эти результаты объясняются, во-первых, малым количеством клеток, взятых для анализа (для чего и предназначена опция «Анализ единичной клетки»). Следует отметить, что данная опция заметно улучшает результаты транскриптомного анализа не только для документированного случая единичных клеток, но и для малых групп порядка десятка штук, как это произошло в нашей ситуации. Дальнейший прогресс вызван, по-видимому, особенностями реализации программного алгоритма анализа, способствующего повышению точности за счет опоры на предоставленную полученной другими способами уже готовую сборку аналогичного транскриптома.

Хотя наилучший результат был получен при использовании программы Trinity, надо подчеркнуть, что размер полученных сборок (RNASpades vs Trinity) отличается почти в пять раз, в то время как эффективность покрытия — всего на 20%, что находит свое отражение и в статистике распределения по длине полученных при сборках контигов.

Результаты сравнения картирования индивидуальных образцов на разные сборки выявили показательное различие транскриптомов тотальной нервной системы и выделенной группы нейронов статодистов. Среднее значение покрытия для тотальной нервной системы на четверть меньше, чем для специфических сборок, несмотря на трехкратное превышение размера тотальной сборки по отношению к сборке Trinity и почти на порядок — для сборок RNASpades. Очевидно, что экспрессионные профили статодистов отличаются от усредненного значения для всей нервной системы, что может служить показателем функциональной специализации данной группы нервных клеток.

Для анализа дифференциальной экспрессии генов в качестве референсных сборок были взяты: а) лучший

вариант RNASpades; б) сборка Trinity; в) сборка транскриптома тотальной нервной системы, предоставленная коллегами (данные не опубликованы). Сравнение уровня экспрессии генов улиток, побывавших в космосе, с их сородичами, оставшимися на Земле, показало, что от 22 (а) до 40 (б) процентов генов значительно изменили свою экспрессию. При этом экспрессия усилилась в 75,7% (а) и 69,3% (б) случаев (табл. 2). Крайне показательно, что дифференциальной экспрессии не обнаружилось при использовании в качестве референса тотальной нервной системы, что лишний раз подчеркивает специфичность ответа статодистов на условия микрогравитации (это не вызывает удивления, если учесть, что они и являются органом рецепции именно гравитации).

Таблица 2

Количество генов, картированных на разные варианты сборки

гены \ сборка	НС	sc+НС	Trinity
Всего неизменных	36556	36466	67560
Всего измененных	0	10323 (22%)	45109 (40%)
Экспрессия повышена	0	75,7%	69,3%
Экспрессия понижена	0	24,3%	30,7%

Примечание: количество генов, картированных на разные варианты сборки, в соответствии с изменением уровня их экспрессии в опыте по сравнению с контролем (обозначение сборок см. табл. 1). Верхние строчки — количество генов по версиям соответствующих программ сборки, нижние — процент от количества генов с измененной экспрессией

Следует отметить, что подавляющее число генов с различием экспрессии экспрессировались только в одной из групп — опыте или контроле. Только лишь около 40 генов, демонстрирующих значимое изменение (а именно — увеличение) экспрессии в условиях микрогравитации, экспрессировались одновременно в обеих группах. Предварительный анализ сравнения их последовательности с известными последовательностями (NCBI BLAST) показал, что они могут быть условно отнесены к белкам клеточных сигнальных систем, что может подтверждать их роль в функционировании статодистов.

Заключение

При анализе данных необходимо учесть, что столь высокий количественный уровень дифференциальной экспрессии, полученный в эксперименте, свидетельствует

ет не только о реальном положении дел, но и отражает трудности работы с этим специфическим геномом. По-видимому, программы анализа завышают количество дифференциально экспрессируемых генов, приписывая к ним небольшие, но очень многочисленные фрагменты мРНК, которые не прошли объединения в протяженные участки, сравнимые с настоящими генами. Особенно к этому склонна Trinity. Можно ожидать, что ситуация значительно исправится с появлением референсного полного секвенированного генома *Helix lucorum*, с опорой на который можно будет провести анализ более информативно.

Дальнейший анализ полученных генов может выявить группы белков, по-разному экспрессирующихся в условиях нормальной и микрогравитации, и прояснить молекулярную специфику работы рассмотренной популяции нейронов, что имеет принципиальное значение для понимания биологических механизмов функционирования данной структуры. Однако перспективы этого анализа осложнены низким сходством протеома исследуемого организма с изученными модельными объектами, представленными в известных базах данных [14].

После завершения функционального анализа и проведения аннотирования релевантные сборки транскриптома и данные по дифференциальной экспрессии будут депонированы в соответствующих общедоступных базах данных (см. *Helix lucorum*, statocysts).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 14-25-00072.

Литература

- Осипов А.А., Асеев Н.А., Чеснокова Е.А., Рошин М.В., Колосов П.М., Н.В. Баль Н.В., Балабан П.М. Сборка de novo транскриптома единичных нейронов статоцистов виноградной улитки // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12. — № 4. — С. 47–55.
- Balaban P.M., Malyshev A.Y., Zakharov I.S., Aseev N.A., Bravarenko N.I., Ierusalimsky V.N., Samarova A.I., Vorontsov D.D., Popova Y., and Boyle R. Structure and function of the snail statocyst system after a 16-day flight on foton-M-2 // Journal of Gravitational Physiology. — Vol. 13. — No. 1. — P. 201–204. <http://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=20070022712>.
- Balaban P.M. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail // Neuroscience and Biobehavioral Reviews. — 2002. — Vol. 26(5). — P. 597–630.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // Journal of Computational Biology. — 2012. — Vol. 19(5). — P. 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Gainutdinova T.H., Tagirova R.R., Ismailova A.I., Muranova L.N., Samarova E.I., Gainutdinov Kh.L., and Balaban P.M. Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis // Learning & Memory. Cold Spring Harbor, N.Y. — 2005. — Vol. 12(6). — P. 620–625. doi: 10.1101/lm.25705.
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., et al. Trinity: Reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data // Nature Biotechnology. — 2011. — Vol. 29(7). — P. 644–652. doi: 10.1038/nbt.1883.
- Gurevich A.A., Saveliev V., Vyahhi N., and Tesler G. QUAST: Quality Assessment Tool for genome assemblies // Bioinformatics. — 2013. — Vol. 29(8). — P. 1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- Haas B.J., Papanicolaou A., Yassour M., Grabherr M., Blood P.D., Bowden J., Couger M.B., et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: Reference generation and analysis with Trinity // Nature Protocols. — 2013. — Vol. 8(8). — P. 1494–1512. doi: 10.1038/nprot.2013.084.
- Kim D., Perte G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., and Salzberg S.L. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions // Genome Biology. — 2013. — Vol. 14(4). — R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- Langmead B., and Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2 // Nature Methods. — 2012. — Vol. 9(4). — P. 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923.
- Liu S., and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: Recent advances and remaining challenges // F1000Research. — 2016. — 5. doi: 10.12688/f1000research.7223.1.
- Lovén J., Orlando D.A., Sigova A.A., Lin Ch.Y., Rahl P.B., Burge Ch.B., Levens D.L., Lee T.I., and Young R.A. Revisiting global gene expression analysis // Cell. — 2012. — Vol. 151(3). — P. 476–482. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.012.
- Marguerat S. and Bähler J. RNA-Seq: From technology to biology // Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS. — 2010. — Vol. 67(4). — P. 569–579. doi: 10.1007/s00018-009-0180-6.
- Senatore A., Edirisinghe N., Katz P.S. Deep mRNA sequencing of the *Tritonia diomedea* brain transcriptome provides access to gene homologues for neuronal excitability, synaptic transmission and peptidergic signaling // PLoS ONE. — 2015. — Vol. 10(2). — e0118321. doi: 10.1371/journal.pone.0118321.
- Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J.L., Pachter L. Differential analysis of gene regulation at

- transcript resolution with RNA-seq // Nature Biotechnology. – 2013. – Vol. 31. – P. 46–53. doi: 10.1038/nbt.2450.
16. Trapnell C., Williams B.A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., van Baren M.J., Salzberg S.L., Wold B.J., and Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation // Nature Biotechnology. – 2010. – Vol. 28(5). – P. 511–515. doi: 10.1038/nbt.1621.

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF DIFFERENTIAL EXPRESSION OF SINGLE NEURONS OF STATOCYSTS IN GRAPE SNAIL

A.A. OSYPOV, P.M. KOLOSOV, N.A. ASEYEV, E.A. CHESNOKOVA,
M.V. ROSHCHIN, N.V. BAL, P.M. BALABAN

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow

Here we analyze the differential expression of genes from the *de novo* assembly of the total transcriptome of receptor hair cells – neurons of statocysts, the balance organ of the *Helix lucorum* grape snail, under microgravity in comparison with the control. The comparison was made for different parameters of the transcriptome assemblies and a given assembly of the transcriptome of the total nervous system. The change in expression in 20–40% of genes was revealed (expression increased approximately in 70%), depending on the assembly. Differential expression appears absent when the total nervous system was used as a reference.

Keywords: statocysts, transcriptome, differential expression, microgravity, grape snail, *Helix lucorum*.

КАК ВЫЧИСЛЯТЬ УРАВНЕНИЯ ХОДЖКИНА – ХАКСЛИ БЫСТРЕЕ

И.Е. МЫСИН*

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская область

В теоретической нейронауке существует дилемма между использованием детальных и простых моделей нейронов. Моделирование с помощью формализма Ходжкина – Хаксли позволяет делать очень точные описания потенциала на мембране нейронов, но этот подход нуждается в высоких вычислительных ресурсах. Простые модели, такие как интегративно-пороговые нейроны, не требуют интенсивных вычислений, однако они ограничены в описании свойств нейрональной активности. В последнее время было предложено несколько моделей, например, модель Ижикевича, которая позволяет воспроизводить сложное поведение потенциала нейронов с низкой требовательностью к вычислительным затратам. Несмотря на это в настоящее время формализм Ходжкина – Хаксли наиболее широко используется в теоретических исследованиях. В настоящей работе мы предлагаем простой способ увеличить скорость вычисления уравнений Ходжкина – Хаксли. На первом этапе мы предлагаем использовать аналитическое решение дифференциального уравнения для обновления воротных переменных. На втором этапе мы предлагаем использовать предвычисленные значения функций, которые зависят только от потенциала, но требуют интенсивных вычислений. Это – функции стационарного состояния и характерного времени воротной переменной. В проведенной работе мы показали, что использование предварительно вычисляемых функций с шагом 0,01 мВ по V дает достаточно точную форму потенциала, но рассчитывается в несколько раз быстрее, чем точное вычисление функций при моделировании.

Ключевые слова: формализм Ходжкина – Хаксли, модель нейрона, ускорение вычисления модели.

Введение

Статьи Ходжкина и Хаксли по физиологии гигантского аксона кальмара были важным этапом в науке о нервной системе [5]. Они предложили уравнения для ионных токов в мембране аксона, описывающие потенциал действия. Однако заслуга Ходжкина и Хаксли гораздо больше, чем просто описание потенциала действия. В своих работах Ходжкин и Хаксли предложили математический формализм для описания любых токов в мембране возбудимых клеток. В последующие годы после работ этих авторов множество теоретических и экспериментальных исследований было направлено на описание других каналов в самых разных отделах мозга в рамках формализма Ходжкина – Хаксли.

На сегодняшний день модели на основе формализма Ходжкина – Хаксли являются самыми детальными, позволяющими описывать большое количество свойств нейронов; по этой же причине такие модели наиболее часто

используются в теоретических статьях. Однако уравнения Ходжкина – Хаксли требуют высоких вычислительных затрат. С 1950-х годов были предприняты многочисленные попытки уменьшить вычислительные затраты с помощью упрощения моделей нейронов. Было предложено множество моделей: ФитцХью – Нагумо модель [4], модель Ижикевича [6], интегративно-пороговые модели [1, 2] и многие другие [7]. Тем не менее в настоящее время модель Ходжкина – Хаксли является наиболее часто используемой в теоретических исследованиях [8]. В предлагаемой статье мы предлагаем простой способ для ускорения вычислений уравнений Ходжкина – Хаксли.

Материалы и методы

В нашей работе мы использовали все уравнения и параметры из статьи [9]. Для демонстрации мы смоделировали четыре типа клеток: быстро разряжающиеся (fast-spiking, FS), регулярно разряжающиеся (regular-spiking, RS), низкопороговые (low-threshold spiking, LTS) и залповые (intrinsically bursting, IB) нейроны.

Все модели были однокомпарментные. Для описания потенциала на мембране использовалось следующее уравнение:

$$C \frac{dV}{dt} = -g_{leak}(V - E_{leak}) - I_{Na} - I_{Kd} - I_M - I_T - I_L + I_{ext}, \quad (1)$$

© 2018 г. Мысин И.Е.

* **Автор для переписки:**

Мысин Иван Евгеньевич

младший научный сотрудник Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН

142290 Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 3

E-mail: imysin@mail.ru

где V — мембранный потенциал, $C=1$ мкФ/см² удельная емкость мембраны, g_{leak} — проводимость тока утечки, E_{leak} — потенциал реверсии тока утечки. I_{Na} и I_{Ka} — натриевый и калиевый токи, ответственные за генерацию потенциалов действия. I_M — медленный потенциал-зависимый калиевый ток, ответственный за частотную адаптацию нейронов. I_L представляет собой высокопороговый кальциевый ток и I_T — низкопороговый кальциевый ток. I_{ext} — ток для имитации внешнего возбуждения, например, в пэтч-кламп экспериментах.

Для обновления V мы использовали метод Эйлера. Уравнения для токов:

$$\begin{aligned} I_{Na} &= g_{Na} m^3 h (V - E_{Na}), \\ I_{Kd} &= g_{Kd} n^4 (V - E_K), \\ I_M &= g_M \rho (V - E_K), \\ I_L &= g_L q^2 r (V - E_{Ca}), \\ I_T &= g_T s^2 u (V - E_{Ca}), \end{aligned} \quad (2)$$

где g_{Na} , g_{Kd} , g_M , g_L , g_T — максимальные проводимости каналов, $E_{Na}=50$ мВ, $E_K=-90$ мВ, $E_{Ca}=120$ мВ реверсные потенциалы натрия, калия и кальция соответственно; m , h , n , ρ , q , r , s , u — являются воротными переменными. Интегрирование воротных переменных описано в разделе «Результаты». Нейроны FS содержат только I_{Na} и I_{Kd} токи. RS нейроны содержат I_{Na} , I_{Kd} и I_M токи. LTS нейроны содержат I_{Na} , I_{Kd} , I_M и I_T токи. IB нейроны содержат I_{Na} , I_{Kd} , I_M и I_L токи.

Для расчета мы применяли самостоятельно разработанный скрипт, написанный на Python. Наш код доступен на GitHub (https://github.com/ivanmysin/Fast_NN_integration).

Экспоненты вычисляются с помощью функции \exp из пакета NumPy. Мы использовали ПК с 4 ядрами (3,28 Гц) процессором и 16 Гб оперативной памяти под Ubuntu 16.04 операционной системы.

Результаты

Типичное уравнение для воротных переменных выглядит следующим образом:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{x_\infty - x}{\tau_\infty}, \quad (3)$$

где x — любая воротная переменная, $x \in \{m, h, n, \rho, q, r, s, u\}$, x_∞ является стационарным значением воротной переменной, τ_∞ — это постоянная времени воротной пере-

менной, x_∞ и τ_∞ являются функциями V . Все зависимости приведены в статье [9].

В нашей работе мы следуем идее, предложенной в [3]. Для интегрирования уравнения мы используем аналитическое решение на каждом шаге. Разделим переменные в уравнении (3) и проинтегрируем на один временной шаг:

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x_\infty - x} = \int_0^{t_s} \frac{dt}{\tau_\infty}, \quad (4)$$

где t_s является временным шагом интегрирования, x_0 является значением воротной переменной на предыдущем шаге. Из уравнения (4) мы получим:

$$\ln(x_\infty - x) - \ln(x_\infty - x_0) = \frac{-t_s}{\tau_\infty} \quad (5)$$

Введем функцию T :

$$T = \exp\left(\frac{-t_s}{\tau_\infty}\right) \quad (6)$$

Выразим из уравнения (5) x и, используя соотношение (6), мы получаем следующее уравнение для обновления воротной переменной:

$$x = x_\infty - (x_\infty - x_0) T \quad (7)$$

x_∞ зависит от V и обычно содержит расчет экспоненты. Функция T зависит от t_s и τ_∞ , но t_s , как правило, определяется в начале вычислений и в ходе самих вычислений не меняется, τ_∞ зависит от V и обычно также содержит расчет экспоненты. Таким образом, x_∞ и T зависят только от V , вычисление требует много времени, потому что \exp является очень медленной функцией. Потенциал нейрона изменяется в небольшом диапазоне величин от -90 мВ до 50 мВ. Мы предлагаем простую идею для оптимизации расчета по формуле (7). Идея состоит в использовании предвычисленных функций x_∞ и T в ходе вычислений, иными словами перед началом симуляции составляются таблицы этих функций, которые используются в дальнейшем. При этом значение потенциала округляется до ближайшего числа в таблице.

На рисунке 1 показаны результаты моделирования различных нейронов с точным расчетом x_∞ и T при моделировании и с использованием предварительно рассчитанных значений этих функций. Мы можем видеть, что шага V , равного 0,01 мВ, достаточно для точного расчета V . Из рисунка 2 следует, что использование функции предварительно вычисленных x_∞ и T быстрее, чем вычисление их при моделировании.

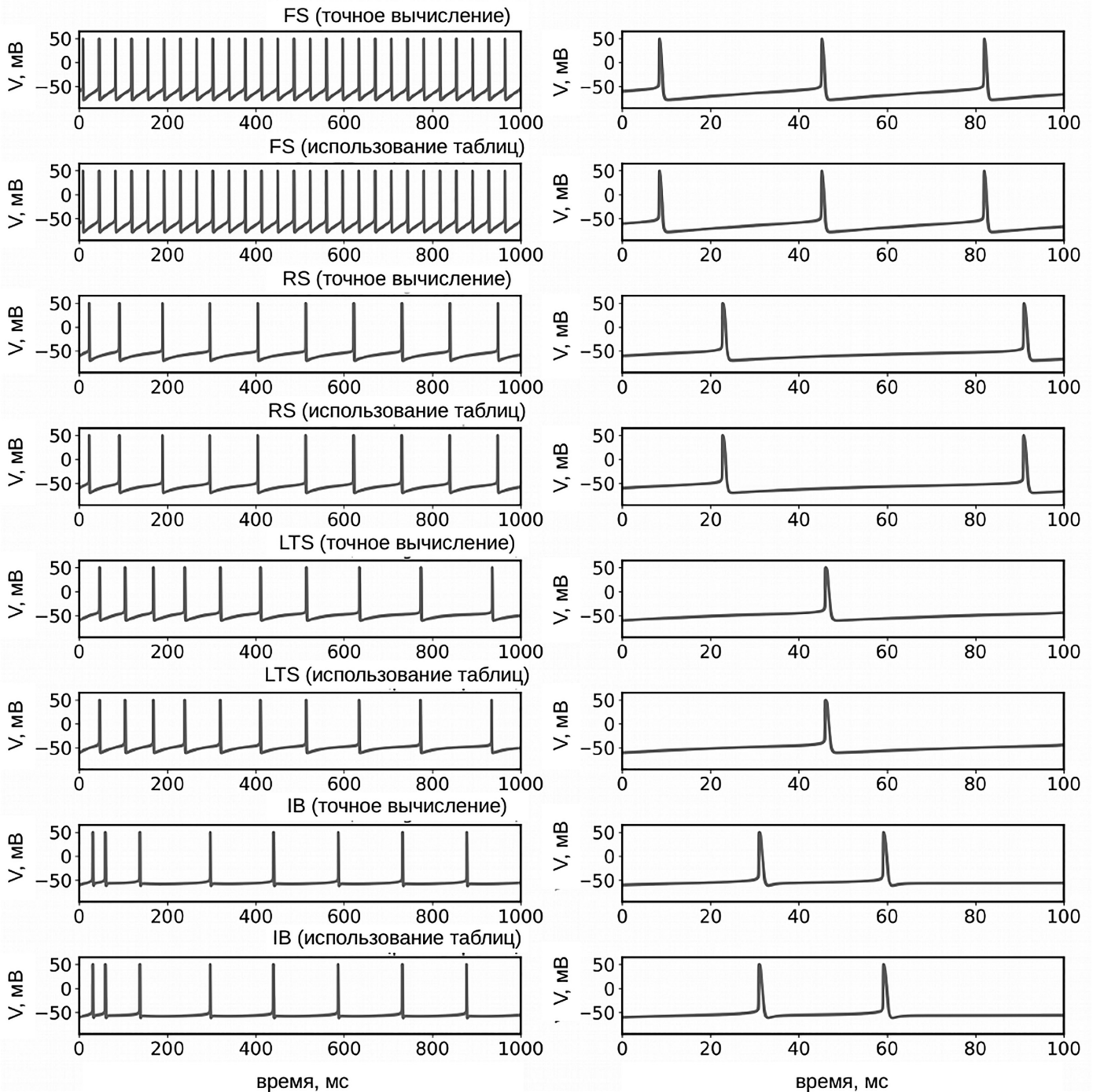


Рис. 1. Слева показано 1 сек моделирование различных нейронов (FS, RS, LTS, IB) с точным вычислением x_∞ и T при моделировании (отмечено как «точное вычисление») и использованием предварительно вычисленных функций (отмечено как «использование таблиц»). Справа показаны те же данные, но только первые 100 мс. Шаг $V=0,01$ мВ для предвычисления x_∞ и T . Шаг для интегрирования по времени 0,01 мс. Параметры уравнений для нейронов. Для FS нейрона: $I_{ext}=0,7$ нА, $E_{leak}=-70$ мВ, $g_{leak}=0,015$ мСм, $V_T=-62$ мВ, $g_{Na}=50$ мСм, $g_{Kd}=10$ мСм. Для RS нейрона: $I_{ext}=0,9$ нА, $E_{leak}=-70,3$ мВ, $g_{leak}=0,02$ мСм, $V_T=-56,2$ мВ, $g_{Na}=56$ мСм, $g_{Kd}=6$ мСм, $g_M=0,07$ мСм, $\tau_{max}=608$ мс (параметр для функций τ_∞ для g_M). Для LTS нейрона: $I_{ext}=0,3$ нА, $E_{leak}=-50$ мВ, $g_{leak}=0,019$ мСм, $V_T=-50$ мВ, $g_{Na}=50$ мСм, $g_{Kd}=4$ мСм, $g_M=0,028$ мСм, $\tau_{max}=4000$ мс (параметр для функции τ_∞ для g_M), $g_T=0,4$ мСм, $V_x=-7$ мВ (параметр для функций x_∞ и τ_∞ для u). Для IB нейрона: $I_{ext}=0,5$ нА, $E_{leak}=-75$ мВ, $g_{leak}=0,01$ мСм, $V_T=-58$ мВ, $g_{Na}=50$ мСм, $g_{Kd}=4,2$ мСм, $g_M=0,042$ мСм, $\tau_{max}=1000$ мс (параметр для функции τ_∞ для g_M), $g_L=0,12$ мСм. V_T – порог генерации потенциала действия (параметр для функций τ_∞ и x_∞ воротных переменных m , h и n)

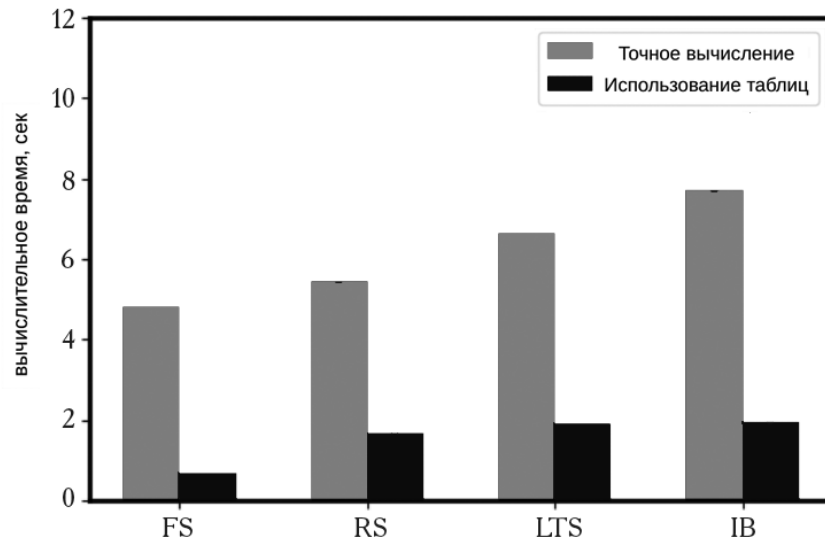


Рис. 2. Затраченное время вычислений для моделирования 1 сек с точным вычислением χ_∞ и T (отмечено как «точное вычисление») и с использованием предварительно вычисленных функций (отмечено как «использование таблиц»). Показано среднее значение по 10 запускам. Параметры моделирования совпадают с рисунком 1

Заключение

В этой статье мы предложили простой способ для ускорения вычислений уравнений Ходжкина — Хаксли. Результаты, представленные на рисунке 2, могут очень сильно отличаться от экспериментов, проведенных при других условиях. В частности, на результаты исследования влияют мощность компьютера, эффективность реализации функции \exp , продолжительность моделирования и т.д. Однако очевидно, что обращение к заранее вычисленному массиву данных работает быстрее, чем вычисление экспоненты на любом компьютере. В нашей работе мы показали значительный выигрыш уже при моделировании одиночных нейронов. Можно ожидать, что использование предвычисленных таблиц при моделировании больших сетей с сотнями многокомпарментных нейронов даст большой прирост производительности.

С другой стороны, предварительно вычисляемые функции χ_∞ и T не требуют много памяти. Например, если мы будем хранить в памяти χ_∞ и T с шагом V 0,01 мВ диапазоне от -100 мВ до 70 мВ, нам нужно сохранить два массива с 17000 элементов в каждом. Даже при том, что нужно хранить эти два массива для каждой воротной переменной в модели, это очень мало по сравнению с размером оперативной памяти современных компьютеров.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № № 16-07-01059 и 05-04-05463.

Литература

1. *Burkitt A.N.* A review of the integrate-and-fire neuron model: I. Homogeneous synaptic input // *Biol. Cybern.* — 2006. — Vol. 95. — No. 1. — P. 1–19.
2. *Burkitt A.N.* A review of the integrate-and-fire neuron model: II. Inhomogeneous synaptic input and network properties // *Biol. Cybern.* — 2006. — Vol. 95. — No. 2. — P. 97–112.
3. *Börgers C., Nectow A.R.* Exponential time differencing for hodgkin-huxley-like odes // *SIAM J. Sci. Comput.* — 2013. — Vol. 35. — No. 3. — P. B623–B643.
4. *FitzHugh R.* Motion picture of nerve impulse propagation using computer animation // *J. Appl. Physiol.* — 1968. — Vol. 25. — No. 5. — P. 628–630.
5. *Hodgkin A.L., Huxley A.F.* A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // *J. Physiol. (Lond).* — 1952. — Vol. 117(4). — P. 500–544.
6. *Izhikevich E.M.* Simple model of spiking neurons // *IEEE Trans. Neural. Netw.* — 2003. — Vol. 14. — No. 6. — P. 1569–1572.
7. *Izhikevich E.M.* Which model to use for cortical spiking neurons? // *IEEE Trans. Neural. Netw.* — 2004. — Vol. 15. — No. 5. — P. 1063–1070.
8. *McDougal R.A. et al.* Twenty years of ModelDB and beyond: building essential modeling tools for the future of neuroscience // *J. Comput. Neurosci.* — 2017. — Vol. 42. — No. 1. — P. 1–10.
9. *Pospischil M., Toledo-Rodriguez M, Monier C, Piwkowska Z, Bal T, Frégnac Y, Markram H, Destexhe A.* Minimal Hodgkin-Huxley type models for different classes of cortical and thalamic neurons // *Biol. Cybern.* — 2008. — Vol. 99. — No. 4–5. — P. 427–441.

HOW TO COMPUTE HODGKIN-HUXLEY EQUATIONS FASTER

I.E. MYSIN

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow region

In theoretical neuroscience, a dilemma exists between the usage of detailed and simple neuron models. Modeling with Hodgkin-Huxley formalism allows for very accurate descriptions of the potential on a neuronal membrane, but this approach requires high computational resources. In contrast, simple models like the integrate-and-fire do not require intensive calculations, but are limited in their description of neuronal activity. Recently, several models have been proposed. For example, Izhikevich's model, which allows for the reproduction of the complex behavior of neuronal potential with low computation cost. However, Hodgkin-Huxley formalism is currently the most widely used in theoretical investigations. In this work, we propose a simple way of decreasing the computation cost of Hodgkin-Huxley equations. For the first step, we have used an analytical solution of the differential equation for the update of gate variables. For the second step, we have proposed the usage of precomputed functions during simulation, which depend only on potential and the required computational time. These functions are steady-state of gate variable and function, which are dependent on the time constant of the gate variable. In the work carried out, we showed that the use of pre-calculated functions with 0.01 mV increment in V gives a fairly accurate shape of the potential, but is calculated several times faster than an exact calculation of the functions in the simulation. We have produced a simple way to simulate Hodgkin-Huxley equations faster without decreasing accuracy of description of the potential on a neuronal membrane.

Keywords: Hodgkin-Huxley formalism, neuron model, speeding up of simulation.

МЕХАНИЗМЫ ПРИОБРЕТЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

Н.В. ГНЕННАЯ*, И.С. САЗЫКИН, М.А. САЗЫКИНА

*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии имени Д.И. Ивановского,
Ростов-на-Дону*

На протяжении последних лет во всем мире отмечается значительный рост устойчивости микроорганизмов к анти-микробным препаратам, что является серьезным препятствием для антибиотикотерапии. Решение проблемы возникновения устойчивости к антибиотикам осложняет также то, что гены резистентности к антибиотикам присутствуют даже у микроорганизмов, которые никогда ранее не контактировали с продуктами человеческой деятельности. В данной работе представлен обзор литературы, посвященный основным механизмам приобретения микроорганизмами устойчивости к антибиотикам.

Ключевые слова: антибиотики, механизмы резистентности, антибиотикоустойчивость, гены антибиотикорезистентности (АРГ).

Введение

Открытие Александром Флемингом 3 сентября 1928 года первого антибиотика заставило человечество поверить в победу над возбудителями инфекционных заболеваний. Производство природных, полусинтетических и синтетических противомикробных препаратов произвело революцию в медицине за счет сокращения заболеваемости и смертности людей от наиболее распространенных инфекций. Однако вскоре после того, как они были введены в клиническую практику, появились устойчивые к этим препаратам штаммы микроорганизмов.

Для преодоления негативного воздействия химиотерапевтических препаратов на бактериальную клетку микроорганизмы включают ряд приспособительных процессов, приводящих к лекарственной устойчивости (Голубовская, 2011) [1]. В настоящее время резистентность приобретает все более угрожающие формы. В начале 2010 года ВОЗ сообщила о появлении штамма *E. coli*, который оказался невосприимчив ни к одному из существующих антибиотиков. Данную устойчивость связывают с наличием энзима NDM-1 (New Delhi metallo-beta-lactamase), который вызывает устойчивость ко всем известным на сегодняшний день видам антибиотиков (Бюллетень ВОЗ, 2010) [2].

Широкое использование антибиотиков и последующее развитие мультирезистентности бактерий представляют серьезную опасность для человека. Данные процессы могут повлиять на естественные микробные сообщества, которые играют ключевую роль в фундаментальных экологических процессах, главные из которых — поддержание плодородия почвы и качества воды.

В связи с вышесказанным актуальным является обзор современной научной литературы, затрагивающей проблему механизмов приобретения резистентности к антибиотикам.

1. Происхождение генов антибиотико-резистентности (АРГ)

АРГ имеют довольно древнее происхождение и берут свое начало из окружающей среды (Davies J., Davies D. 2010) [20]. Они существовали еще до того, как человек начал пользоваться антибиотиками в терапии и, вероятно, существуют с тех пор, как и сами антибиотики.

Поскольку ряд антибиотиков синтезируется микроорганизмами, обитающими в окружающей среде, было высказано предположение, что гены устойчивости должны происходить от продуцентов антибиотиков (так как если они не будут обладать такими генами, собственный антибиотик приведет к их гибели).

Некоторые антибиотики, используемые для лечения инфекций, синтезируются почвенными микроорганизмами. Предполагается, что их функция заключается в подавлении роста конкурентных микроорганизмов. Также высказано предположение, что некоторые антибиотики имеют сигнальную функцию, поскольку в малых концентрациях способны вызывать определенные транскрипционные изменения, независимые от общей стресс-

© 2018 г. Гненная Н.В., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А.

* **Автор для переписки:**

Гненная Надежда Владимировна

младший научный сотрудник,

Южный федеральный университет

344090 Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/2

E-mail: gnennaya@sfedu.ru

совой реакции сообщества микроорганизмов (Fajardo, Martinez, 2008) [22].

Таким образом, проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов уходит своими корнями в экологические и эволюционные отношения между самими микроорганизмами окружающей среды (Супотницкий, 2011 [6]; Петрова и др., 2012 [3]; Сазыкина и др., 2016 [4]). Было прослежено происхождение только двух из всех АРГ, приобретенных микроорганизмами, являющимися патогенными для человека, — ген *QnrA*, обеспечивающий устойчивость к хинолонам у *Shewanella algae* (Poirel et al., 2005) [47], и ген *CTX-M*, обеспечивающий устойчивость к семейству бета-лактамаз у рода *Kluyvera* (Canton et al., 2012) [15]. Причем, ни один из данных микроорганизмов не является продуцентом антибиотиков.

2. Формы устойчивости к антибиотикам

Устойчивость к антибиотикам может быть разделена на две формы: естественная устойчивость, которая обычно встречается у бактерий в различных природных средах, и приобретенная, обусловленная антропогенными причинами.

Естественная устойчивость характеризуется сохранением бактериями жизнеспособности в присутствии антибактериальных препаратов, в концентрациях, которые реально достижимы в организме человека. Является постоянным видовым признаком, закодирована в хромосомных генах и ее легко прогнозировать. Данная природная устойчивость характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени для проявления действия антибактериальных препаратов. Например, устойчивость к бета-лактамам антибиотикам связана с отсутствием у этих бактерий пептидогликана.

Под приобретенной резистентностью понимают способность отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при концентрациях антибактериальных препаратов, подавляющих основную часть микробной популяции (Сидоренко, Тишков, 2004) [5]. Немаловажным отличием от природной резистентности является то, что прогнозирование приобретенной резистентности невозможно, поскольку приобретенная резистентность является результатом мутации или приобретением новой ДНК. Мутация представляется спонтанным событием, которое не зависит от наличия антибиотика. Бактерии, обладающие такой мутацией, имеют значительное преимущество, потому что восприимчивые клетки быстро погибают, оставляя резистентную субпопуляцию.

Возникновение устойчивости к антибиотикам в основном связывают с неадекватным назначением антибактериальных препаратов, их недостаточной дозировкой.

3. Механизмы приобретения резистентности к антибиотикам микроорганизмами

Патогенные бактерии приобретают АРГ из пула генов окружающей среды посредством одного из трех процессов горизонтального переноса генов (horizontal gene transfer — HGT): конъюгация, трансформация и трансдукция.

3.1. Конъюгация

Среди механизмов, способствующих горизонтальному переносу генов, конъюгация является наиболее изученной (Guglielmini et al., 2013) [28]. Конъюгация — это многоступенчатый процесс переноса молекулы ДНК, требующий контакта клеток донора и реципиента посредством адгезии или образования пилей. Конъюгативный механизм кодируется либо генами самостоятельно реплицирующихся плазмид, либо интегративными конъюгативными элементами в хромосоме (Smillie et al., 2010) [51]. Кроме того, конъюгативный механизм может обеспечить мобилизацию плазмид, которые не являются конъюгативными, как это наблюдается, например, для IncQ плазмид широкого спектра хозяев (Meyer, 2009) [41].

АРГ во многих случаях связаны с конъюгативными элементами, такими как плазмиды или транспозоны.

Хотя перенос АРГ может осуществляться также путем трансформации или трансдукции, конъюгация часто рассматривается в качестве более надежного механизма. Это связано с тем, что она обеспечивает лучшую защиту от окружающей среды, чем трансформация, и чаще всего имеет более широкий круг хозяев, по сравнению с трансдукцией.

Конъюгация мобильных генетических элементов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, наблюдается во многих типах экосистем, начиная от переноса между бактериями насекомых, почвы и водной среды, к различным патогенам, связанным с продуктами питания и здоровьем. Важно отметить, что был описан перенос плазмид и конъюгативных транспозонов, принадлежащих к семейству Tn916, в бактериях, относящихся к разным таксонам (Tamminen et al., 2012) [54]. Данный факт показывает, что этот механизм вносит существенный вклад в распространение генов антибиотикорезистентности при помощи широкого диапазона хозяев мобильных генетических элементов.

Плазмиды являются весьма эффективным средством горизонтального переноса генов посредством конъюгации. Во время этого процесса на поверхности клеток как доноров, так и реципиентов, формируется мостик для передачи конъюгативной плазмиды. После

попадания в клетку хозяина плазмиды могут оставаться в цитоплазме, либо встраиваться в ДНК клетки.

Как только гены устойчивости внедряются в подходящую плазмиду, они могут быстро распространяться среди микроорганизмов, которые относятся к разным таксономическим группам. Это хорошо продемонстрировано на примере *bla*_{CTX-M} генов бета-лактамаз расширенного спектра, которые распространились между плазмидами широкого и узкого круга хозяев среди *Enterobacteriaceae*, а также других условно патогенных микроорганизмов человека (Canton et al., 2012) [15]. Передача плазмид патогенным микроорганизмам привела к распространению многочисленных АРГ, кодирующих устойчивость к бета-лактамам, аминогликозидам, тетрациклину, сульфаниламидам и многим другим классам лекарств (Huddleston, 2014) [30]. Особую тревогу вызывает массовое распространение опосредованной плазмидами устойчивости к карбапенему (Carattoli, 2013) [16], а также к колистину в Китае (Liu et al., 2015) [35], которая впоследствии была идентифицирована на многих континентах (Arcilla et al., 2015) [8] и может привести к тому, что микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* станут панрезистентны. Более того, множество АРГ локализуется на одной и той же плазмиде, что позволяет довольно легко распространять множественную лекарственную устойчивость (Von Wintersdorff et al., 2016) [56].

У *Enterobacteriaceae* очень часто наблюдается опосредованная плазмидами устойчивость к бета-лактамам и хинолонам, которые используются в качестве первой линии antimикробной терапии при лечении. В настоящее время активно распространяется плазмидная устойчивость к хинолонам и бета-лактамам. Еще одним примером опосредованной плазмидами устойчивости является устойчивость к ванкомицину у *Enterococcus*. Энтерококки представляют серьезную проблему для здравоохранения во всем мире, потому что имеют устойчивость сразу к нескольким видам антибиотиков (Talebi et al., 2014) [53].

3.2. Трансформация

В 1928 году Гриффит первым продемонстрировал прямой генетический обмен между различными штаммами *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928) [27]. Выяснилось, что некоторые бактерии способны поглощать, внедрять и функционально экспрессировать фрагменты внеклеточной ДНК. Данный процесс называется трансформацией. Вскоре стало ясно, что бактерии могут использовать процесс трансформации, чтобы избегать воздействия антибиотиков, посредством обмена АРГ.

Чтобы произошла трансформация, необходимо выполнить несколько условий: во внеклеточной среде должна присутствовать ДНК; бактерии-реципиенты должны находиться в состоянии компетентности; поглощенная ДНК должна стабилизироваться либо путем интеграции в геном реципиента, либо путем закольцовывания (в случае плазмидной ДНК) (Thomas and Nielsen, 2005) [55]. *Neisseria* spp. и некоторые другие виды бактерий, способные к естественной трансформации, могут развивать компетентность только при определенных условиях, например, необходимо присутствие пептидов или аутоиндукторов, состояние питания или другие стрессовые состояния (Johnston et al., 2014) [32].

Эксперименты *in vitro* внесли большой вклад для выяснения роли трансформации в передаче АРГ. В ранних работах была показана возможность трансформации бактериальной клетки генетическим материалом, несущим АРГ. С этой целью гены устойчивости к стрептомицину, рифампицину, эритромицину, налидиксовой кислоте, канамицину трансформировали в *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus* spp., *Gallibacterium anatis* и *Streptococcus pneumoniae* (Prudhomme et al., 2006) [49]. Молекулярные методы позволили идентифицировать перенесенные в клетки АРГ. Исследования *in vitro* показали, что гены *parC* и *gyrA* участвуют в трансформации устойчивости к фторхинолонам между *S. pneumoniae* (Ferrandiz et al., 2000) [23] и некоторыми стрептококками группы *Viridans* (Janoir et al., 1999) [31] и что трансформация *penA* придает устойчивость к пенициллину видам *Neisseria* (*N. flavescens*, *N. cinerea* и *N. meningitidis*) (Bowler et al., 1994) [12].

Молекулярные методы также позволили найти доказательства того, что трансформация происходит и в естественных условиях. Spratt B.G. идентифицировал вариант гена *penA*, ответственный за резистентность к пенициллину в клинических изолятах *N. gonorrhoeae*. Анализ последовательностей выявил мозаичную структуру с блоками, гомологичными чувствительному типу *penA*, и блоками, которые значительно отличаются (Spratt et al., 1992) [52]. Эти «устойчивые блоки» можно проследить до штамма *N. flavescens*, который был выделен в доантибиотическую эпоху, указывая тем самым на то, что такие комменсальные виды могли быть исходным источником для повсеместного распространения резистентности к пенициллину (Lujan et al., 1991) [36]. Мозаичные гены образуются, когда участки чужеродной ДНК включены в геном реципиента, как это происходит при трансформации. Их присутствие подразумевает, что произошел горизонтальный перенос генов (Hakenbeck,

1998) [29]. Полагают, что в стрептококках гены мозаичного пенициллин-связывающего белка, которые кодируют пенициллин-связывающие белки с пониженной аффинностью к бета-лактамам антибиотикам, являются результатом переноса гена из родственных видов, резистентных к пенициллину (Sibold et al., 1994) [50] и способствуют распространению устойчивости к пенициллину среди разных видов стрептококков.

Исследования устойчивости к фторхинолонам показали, что мозаичные варианты генов *parC*, *parE* и *gyrA* легко трансформируются между *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis*, а также между *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus dysgalactiae* (Pletz et al., 2006) [46].

Мао et al. (2014) [37] разработали методику экстракции внутри- и внеклеточной ДНК из образцов окружающей среды и применили ее к образцам, отобраным в объектах речного бассейна в Китае. Результат — большее изобилие ДНК вне клеток, чем внутри, — подразумевает, что в определенных средах внеклеточная ДНК является большим резервуаром для генов, которые могут быть доступны посредством трансформации.

Кроме того, было показано, что мобильные генетические элементы, такие как транспозоны, интегроны и генные кассеты, могут эффективно распространяться между видами, независимо от их уровня генетической связанности (Domingues et al., 2012) [21], и что стрептококковые виды также обмениваются конъюгативными транспозонами посредством трансформации в дополнение к конъюгации (Chancey et al., 2015) [17]. Все это указывает на то, что трансформация обеспечивает широкую возможность горизонтального распространения элементов устойчивости между дивергентными видами.

3.3. Трансдукция

Бактериофаги играют важную роль в формировании бактериального микробиома в любой среде. Через специализированную или генерализованную трансдукцию бактериофаги могут переносить гены, которые являются выгодными для их микробных хозяев, что, в свою очередь, способствует их выживанию и распространению. Переносимые последовательности ДНК варьируют от хромосомной ДНК до мобильных генетических элементов, таких как плазмиды, транспозоны и геномные острова (Modi et al., 2013) [42].

Мобилизация или передача АРГ бактериофагами зарегистрирована для различных видов бактерий: трансдукция АРГ к эритромицину, тетрациклин- или множественной устойчивости между штаммами *S. pyogenes*;

перенос АРГ к тетрациклину и гентамицину между энтерококками (Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011) [40]; транспортировка генов β -лактамаз бактериофагами в *Escherichia coli* и *Salmonella* (Billard-Pomares et al., 2014) [11].

Недавние исследования с применением метагеномных подходов к образцам из различных сред продемонстрировали, что бактериофаги могут играть более значимую роль в распространении АРГ, чем считалось ранее. Была использована полимеразная цепная реакция (ПЦР), чтобы показать, что гены устойчивости к бета-лактамам антибиотикам *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* и *mecA* присутствовали в бактериофагах из речных и городских проб сточных вод. Кроме того, клонирование ДНК фага в ампициллин-чувствительной *E. coli* привело к образованию устойчивых трансформантов, содержащих либо *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, либо АРГ, которые неизвестны (Colomer-Lluch et al., 2011) [18]. Modi et al. установили, что лечение антибиотиками расширяет взаимодействие между фагом и бактериальными видами (Modi et al., 2013) [42], что особенно важно, учитывая повышенное воздействие антибиотиков на окружающую среду. Кроме того, в ряде исследований использовали ПЦР для обнаружения АРГ у бактериофагов из образцов сточных вод (Colomer-Lluch et al., 2011) [18], образцов фекалий человека и животных, образцов сточных вод больниц (Marti et al., 2014) [38]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что бактериофаги являются значительным резервуаром АРГ.

Сообщается, что у некоторых бактериофагов имеется широкий спектр хозяев, который относится к разным видам или даже к разным таксономическим классам (Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011) [40].

Исследования АРГ, переносимых бактериофагами в различных бактериальных сообществах и средах, обеспечивают понимание роли трансдукции в распространении АРГ в микробных экосистемах.

4. Мутации

Спонтанные мутации — это один из ключевых механизмов, которые микроорганизмы используют, чтобы выжить в условиях стресса. Экологические стресс-факторы, подобные воздействию антибиотиков, позволяют отбирать микроорганизмы с нарушением механизмов репарации. Такие микроорганизмы с меньшей точностью репликации ДНК накапливают комплекс мутаций, развивая сложные механизмы сопротивления и получая преимущество при выживании (Cag et al., 2016) [13].

Мутации, приводящие к возникновению антибиотикорезистентности, как правило, происходят в трех

типах генов: в генах, кодирующих мишень антибиотика; в генах, кодирующих переносчики антибиотиков; в генах, кодирующих регуляторы, которые могут подавить экспрессию транспортеров. Хотя мутации в данных генах вносят существенный вклад в приобретение устойчивости к антибиотикам, эти гены не являются АРГ. Поэтому классификация подобных генов как генов устойчивости может привести к неправильной оценке риска распространения устойчивости к антибиотикам (Barbosa, Levy, 2000) [9].

Хромосомные мутации у бактерий возникают редко. Мутации возникают в результате ошибок при репликации хромосом или при неправильной репарации ДНК, такие мутации называют спонтанными. Например, устойчивость к хинолонам у *E. coli* возникает из-за изменений, как минимум, в семи аминокислотах гена *gyrA* или в трех аминокислотах гена *parC*, в то время как только одна точечная мутация в гене *proB* приводит к возникновению полной устойчивости к рифампицину. Пониженное сродство к сульфаниламидам наблюдается в результате хромосомной мутации в дигидроптероат-синтетазе (Khameneh et al., 2016) [33].

5. Интегроны

Приобретение АРГ может быть опосредовано передачей генетических элементов, таких как плазмиды, транспозоны и нуклеотидные последовательности интегров. Роль плазмид уже обсуждалась выше при описании процесса конъюгации.

Интегроны являются естественными клонирующими и экспрессирующими системами, которые включают открытые рамки считывания и посредством сайт-специфической рекомбинации превращают их в функционирующие гены благодаря наличию промоторной последовательности.

В настоящее время установлено, что эти подвижные элементы служат основными переносчиками полирезистентности к антибиотикам у грамотрицательных и, в меньшей степени, — у грамположительных микроорганизмов. На сегодняшний день определены пять классов мобильных интегров, основанных на последовательности, кодирующей интегразу. Известно, что три класса (класс 1, 2, 3) играют важную роль в распространении устойчивости к антибактериальным препаратам. Эти классы хорошо описаны в литературе и связаны с мультirezистентным фенотипом (Cambrey et al., 2010) [14].

В ряде исследований продемонстрирована высокая распространенность интегров 1 класса *A. baumannii* в изолятах Европы, Азии и США (Lee et al., 2009)

[34]. Из-за большой скорости распространения интегроны 1-го класса являются основной экспериментальной моделью интегров. Этот класс обычно связывают с функциональными или нефункциональными транспозонами, происходящими из Tn402, которые могут быть вставлены в более крупные транспозоны, такие как Tn21. Интегроны 1-го класса были связаны с многими IS-элементами, включая IS26, IS1999, IS2000 и IS6100 (Fluit et al., 2004) [24].

Интегроны 2-го класса включены в семейство транспозонов Tn7 и состоят из гена интегразы, за которым следуют генные кассеты. Tn7 является сложным подвижным генетическим элементом, содержащим транспозиционный модуль, образованный пятью генами транспонирования: *tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD*, *tnsE*. Интегроны 3-го класса менее распространены, чем 2-го класса, и также расположены в транспозонах (Cambrey et al., 2010) [14].

Несмотря на то, что 1-й класс интегров считается наиболее распространенным в *A. baumannii*, исследования, проведенные в латиноамериканских странах, таких как Чили, Аргентина и Бразилия, показали, что среди изолятов *A. baumannii* этих регионов наиболее распространены интегроны 2-го класса (Pagano et al., 2012) [44]. Fonseca et al. было продемонстрировано, что все интегроны 2-го класса, полученные из бразильских изолятов, находились в составе транспозона Tn7. Кроме того, в их составе имелась генная кассета, содержащая гены *dfrA1* (устойчивость к триметоприму), *sat2* (устойчивость к стрептотрицину) и *aadA1* (устойчивость к стрептомицину и спектиномицину) (Fonseca et al., 2011) [25].

Martins et al. занимались исследованием связи интегров 2-го класса и генных кассет с клональными линиями *A. baumannii*. Они сообщили о связи 1- и 2-го класса интегров со штаммами CC109/1 и CC113/79 *A. baumannii*. Авторы предположили, что преобладание 2-го класса интегров у микроорганизмов в Латинской Америке может быть объяснено высоким уровнем распространенности штамма CC113/79. В том же исследовании аналогичная распространенность была отмечена у *A. nosocomialis* (Martins et al., 2015) [39].

В интегронах было идентифицировано более 130 различных генных кассет, содержащих гены устойчивости. Отдельные гены, проявляясь в генных кассетах, способствуют устойчивости к различным классам антимикробных препаратов. Вместе эти генные кассеты обеспечивают устойчивость к большинству классов антибиотиков, включая β -лактамы, все аминогликозиды,

хлорамфеникол, стрептоотрицин, рифампицин, эритромицин, фосфомицин, линкомицин, хинолоны и антисептики семейства четвертичных аммонийных соединений. Помимо этих генов, в генных кассетах было идентифицировано несколько открытых рамок считывания с неизвестными функциями (Partridge et al., 2009) [45].

6. Транспозоны

Лекарственная устойчивость может быть опосредована инсерциями транспозонов, представляющих собой подвижные генетические системы, содержащие гены устойчивости к антибиотикам. Они имеют много различных форм, отличающихся по структуре, генетическому родству, механизмам транспозиции и могут переносить различные гены устойчивости. Все эти элементы могут перемещаться как на внутри-, так и на межмолекулярном уровне, и данный механизм, как правило, не требует гомологии ДНК между элементом и сайтом инсерции. Однако имеются случаи, когда конкретный транспозон имеет гомологию с той или иной нуклеотидной последовательностью (Craig, 1997) [19].

Последовательности транспозонов могут содержать десятки генов. Они подразделяются на два основных класса: 1) составные транспозоны, которые содержат в своей центральной части гены устойчивости; кроме того, эти АРГ фланкированы инсерционной последовательностью (Is-элементы) на каждом конце; 2) сложные транспозоны, имеющие более сложную структуру, чем Is-элементы или составные транспозоны. Классическим сложным транспозоном является Tn3, который получен из плазмиды резистентности R1 (Pagano et al., 2016) [43].

Для транспозона, переносащего АРГ и зависящего от Is-элемента, необходимы две копии Is-элемента в виде фланкирующих терминальных структур, представляющих собой либо прямые, либо инвертированные повторы, между которыми находятся гены устойчивости к антибиотикам. Хотя инвертированное расположение Is-элементов является более генетически стабильным, прямые повторы дают возможность мигрировать в другой сайт, где находятся такие же повторы. Это происходит в результате двухступенчатой гомологичной рекомбинации, при которой часть составной структуры вырезается. Выделенная ДНК затем может быть подвергнута репарации.

Хорошо известны транспозоны Tn5, кодирующие устойчивость к аминогликозидам, таким как канамицин и неомицин, и Tn10, переносащие устойчивость к тетрациклину. Они являются составными структурами, обнаруженными у ряда грамотрицательных микроорганизмов, в частности, у *Enterobacteriaceae*. Такие составные струк-

туры образуются случайно и закрепляются в популяции клеток посредством селективных сил, воздействующих на бактериальную флору. Например, популяция, имеющая транспозоны, содержащие АРГ к тетрациклину, канамицину/неомицину, обладает неоспоримым преимуществом выживания при воздействии данными антибиотиками.

Со временем структура претерпевает изменения, которые стабилизируют ее. Многие подобные структуры имеют позднее происхождение, в отличие от Tn3, кодирующего устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, и Tn21, кодирующего устойчивость к стрептомицину, сульфаниламидам, а также ионам ртути. Tn3 и Tn21 являются примерами сложных транспозонов, которые часто встречаются у представителей *Enterobacteriaceae*. Tn3, Tn21 и подобные элементы могут быть более древними, чем большинство транспозонов, и, вероятно, являются результатом нескольких рекомбинаций, включая вставки и делеции, которые сначала вставляют нерекombинирующие участки в определенный элемент, после чего «совершенствуют» последовательность, удаляя «необязательные» функции. Это позволяет сделать элемент более компактным и, следовательно, более мобильным. Было показано, что увеличение размера определенных мобильных генетических элементов снижает частоту их транспозиции (Bennett, 2008) [10].

7. Острова резистентности

Геномные острова, содержащие генетические детерминанты устойчивости, называются островами резистентности. Острова резистентности были описаны в основном у *Proteobacteria*, включая *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, и не так давно острова резистентности были описаны у *Acinetobacter baumannii* (Fournier et al., 2006) [26]. *Acinetobacter baumannii* содержит большие кластеры генов, полученных за счет горизонтального переноса, обеспечивающие устойчивость к нескольким антибиотикам и тяжелым металлам, которые расположены в специфических сайтах определенных генов АТФазы (Post et al., 2010) [48].

В своей работе Fournier et al. первыми описали остров резистентности у *A. baumannii* (AbaR). AbaR представляет собой регион, который был включен в определенный участок хромосомы, содержащий последовательность ACCGC. Основа AbaR состоит из пяти открытых рамок считывания — *orf1*, *tniA*, *tniB*, *orf2*, *orf3*, которые составляют транспозиционный модуль, и двух генов, кодирующих универсальный стресс-белок (*uspA*) и сульфатную пермазу (Fournier et al., 2006) [26].

Было описано несколько AbaR, содержащих разнообразные резистентные гены, в том числе

*bla*_{OXA-23}-подобные, которые предоставляют устойчивость к карбапенемам (Zhu et al., 2013) [57]. Эти острова резистентности были описаны у штамма *A. baumannii*, принадлежащего к известным в мире клонам — Европейскому клону I (ЕСI) и Европейскому клону II (ЕСII), которые известны своей повышенной способностью распространяться по всему миру (Post et al., 2010) [48].

Несколько других островов резистентности, таких как *AbaR1*, *AbaR3*, *AbaR5*, *AbaR6*, *AbaR7*, *AbaR8*, *AbaR9* и *AbaR10*, было обнаружено у штаммов ЕСI. Данные острова имеют структуру, основой которой является транспозон размером 16,3 т.п.н. (Tn6019), прерванный большим составным транспозоном, содержащим область с переменной устойчивостью, ограниченную копиями Tn6018.

AbaR1 на сегодняшний день является самым крупным описанным островом резистентности. Этот остров содержит 86 т.п.н. Из 45 описанных генов 25 были связаны с устойчивостью к нескольким классам антибиотиков. К ним относятся гены, которые ранее не были описаны у *Acinetobacter*, такие как *strA*, *strB*, *aphA1*, *aac69* (кодирующие устойчивость к аминогликозидам), гены устойчивости к тетрациклинам, *tetA*, *tetR*, *dfxX* и ген устойчивости к хлорамфениколу *cmlA* (Post et al., 2010) [48].

Вариант острова резистентности *AbaR3*, по видимому, является предком нескольких вариантов *AbaR*, которые возникли из *AbaR3* путем потери сегментов разной длины, включающих в себя один или несколько АРГ. *AbaR3* содержит восемь генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам. Уникальные последовательности в *AbaR3* включают в себя ген *bla*_{TEM}, который ассоциирован с транспозоном Tn и небольшим кластером генов, два из которых кодируют ДНК-топоизомеразу и белок, связывающий одноцепочечную ДНК (Adams et al., 2008) [7]. Кроме того, следует отметить, что наличие генов ДНК-топоизомеразы, имеющих плазмидную локализацию, может способствовать передвижению островов резистентности.

Заключение

Возникновение множественной устойчивости к антибиотикам стало глобальной проблемой и угрожает здоровью общества. Необходимо изучать роль окружающей среды в возникновении и распространении АРГ, поскольку разные виды деятельности человека способствуют эволюции резистентности, увеличению численности и распространению АРГ в резистоме микробных сообществ окружающей среды, что в конечном итоге способствует обмену генами антибиотикорезистентности

между бактериями и имеет решающее значение для дальнейшего развития клинической резистентности.

Источники финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках научного проекта № 6.2379.2017/ПЧ; при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-00787А; гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-9072.2016.11.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Голубовская А.О. Резистентность к антибиотикам — проблема XXI века // Новости медицины и фармации в Украине. — 2011. — № 4. — С. 20–21.
2. Конли Д. Резистентность к противомикробным препаратам: повторение «трагедии общего достояния» // Бюллетень ВОЗ. — 2010. — Вып. 88. — № 11. www.who.int/bulletin/volumes/88/11/10-031110/ru.
3. Петрова М.А., Горленко Ж.М., Щербатова Н.А., Миндлин С.Э. Новый мобильный элемент ISPrp1 древнего штамма *Psychrobacter maritimus*: перемещение в клетках *Escherichia coli* K12 и образование сложных транспозонов // Генетика. — 2012. — Т. 48(3). — С. 324–332.
4. Сазыкина М.А., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Хаммами М.И., Селиверстова Е.Ю. Антибиотики и гены антибиотикорезистентности в окружающей среде // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12(2). — С. 30–40.
5. Сидоренко С.И., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. — 2004. — Т. 44. — С. 263–306.
6. Снопницкий М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // Биопрепараты. — 2011. — Т. 2. — С. 4–11.
7. Adams M.D., Goglin K., Molyneaux N. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* // J. Bacteriol. — 2008. — Vol. 190. — P. 8053–8064.
8. Arcilla M.S., van Hattem J.M., Matamoros S., Melles D.C., Penders J., de Jong M.D., et al. Dissemination of the MCR-1 colistin resistance gene // Lancet Infect. Dis. — 2015. — Vol. 16. — P. 147–149.
9. Barbosa T.M., Levy S.B. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA // J. Bacteriol. — 2000. — Vol. 182. — P. 3467–3474.

10. Bennett P.M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria // Br. J. of Pharmacol. — 2008. — Vol. 153. — P. 347–357.
11. Billard-Pomares T., Fouteau S., Jacquet M.E., Roche D., Barbe V., Castellanos M. Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum β -lactamase from an *Escherichia coli* strain // Antimicrob. Agents Chemother. — 2014. — Vol. 58. — P. 6550–6557.
12. Bowler L.D., Zhang Q.Y., Riou J.Y., Spratt B.G. Interspecies recombination between the *penA* genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation // J. Bacteriol. — 1994. — Vol. 176. — P. 333–337.
13. Cag Y., Caskurlu H., Fan Y., Cao B., Vahaboglu H. Resistance mechanisms // Ann. Transl. Med. — 2016. — Vol. 4(17). — P. 326.
14. Cambray G., Guerout A.M., Mazel D. Integrons // Annu. Rev. Genet. — 2010. — Vol. 44. — P. 141–166.
15. Canton R., Gonzalez-Alba J.M., Galan J.C. CTX-M enzymes: Origin and diffusion // Front. Microbiol. — 2012. — Vol. 3. — P. 110.
16. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance // Int. J. Med. Microbiol. — 2013. — Vol. 303. — P. 298–304.
17. Chancey S.T., Agrawal S., Schroeder M.R., Farley M.M., Tettelin H., Stephens D.S. Composite mobile genetic elements disseminating macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* // Front. Microbiol. — 2015. — Vol. 6. — P. 26.
18. Colomer-Lluch M., Jofre J., Muniesa M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples // PLoS ONE. — 2011. — Vol. 6. — e17549.
19. Craig N.L. Target site selection in transposition // Ann. Rev. Biochem. — 1997. — Vol. 66. — P. 437–474.
20. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2010. — Vol. 74. — P. 417–433.
21. Domingues S., Harms K., Fricke W.F., Johnsen P.J., da Silva G.J., Nielsen K.M. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species // PLoS Pathog. — 2012. — Vol. 8. — e1002837.
22. Fajardo A., Martinez J.L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses // Curr. Opin. Microbiol. — 2008. — Vol. 11. — P. 161–167.
23. Ferrandiz M.J., Fenoll A., Linares J., De La Campa A.G. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2000. — Vol. 44. — P. 840–847.
24. Fluit A.C., Schmitz F.J. Resistance integrons and super-integrons // Clin. Microbiol. Infect. — 2004. — Vol. 10. — P. 272–288.
25. Fonseca E.L., Freitas F.D., Scheidegger E.M.D., Jacinto T., Vicente A.C.P. Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2011. — Vol. 38. — P. 95–96.
26. Fournier P.E., Vallenet D., Barbe V. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* // PLoS Genet. — 2006. — Vol. 2. — e7.
27. Griffith F. The significance of pneumococcal types // J. Hyg. (Lond.). — 1928. — Vol. 27. — P. 113–159.
28. Guglielmini J., de la Cruz F., Rocha E.P. Evolution of conjugation and type IV secretion systems // Mol. Biol. Evol. — 2013. — Vol. 30. — P. 315–331.
29. Hakenbeck R. Mosaic genes and their role in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* // Electrophoresis. — 1998. — Vol. 19. — P. 597–601.
30. Huddleston J.R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes // Infect. Drug Resist. — 2014. — Vol. 7. — P. 167–176.
31. Janoir C., Podglajen I., Kitzis M.D., Poyart C., Gutmann L. In vitro exchange of fluoroquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci and genomic organization of the *parE-parC* region in *S. mitis* // J. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 180. — P. 555–558.
32. Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J.P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control // Nat. Rev. Microbiol. — 2014. — P. 12. — Vol. 181–196.
33. Khameneh B., Diab R., Ghazvini K., Sedigheh B., Bazzaz F. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them // Microb. Pathog. — 2016. — Vol. 95. — P. 32–42.
34. Lee Y.T., Huang L.Y., Chen T.L. Gene cassette arrays: antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons // J. Microbiol. Immunol. Infect. — 2009. — Vol. 42. — P. 210–219.
35. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study // Lancet Infect. Dis. — 2015. — Vol. 16. — P. 161–168.
36. Lujan R., Zhang Q.Y., Saez Nieto J.A., Jones D.M., Spratt B.G. Penicillin-resistant isolates of *Neisseria lactamica* produce altered forms of penicillin-binding protein 2 that arose by interspecies horizontal gene transfer // Antimicrob. Agents Chemother. — 1991. — Vol. 35. — P. 300–304.
37. Mao D., Luo Y., Mathieu J., Wang Q., Feng L., Mu Q. Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation // Environ. Sci. Technol. — 2014. — Vol. 48. — P. 71–78.
38. Marti E., Variatza E., Balcazar J.L. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment // Clin. Microbiol. Infect. — 2014. — Vol. 20. — O456–O459.

39. Martins N., Picao R.C., Adams-Sapper S., Riley L.W., Moreira B.M. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates // Antimicrob. Agents Chemother. — 2015. — Vol. 59. — P. 698–701.
40. Mazaheri Nezhad Fard R., Barton M.D., Heuzenroeder M.W. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci // Lett. Appl. Microbiol. — 2011. — Vol. 52. — P. 559–564.
41. Meyer R. Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids // Plasmid. — 2009. — Vol. 62. — P. 57–70.
42. Modi S.R., Lee H.H., Spina C.S., Collins J. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome // Nature. — 2013. — Vol. 499. — P. 219–222.
43. Pagano M., Martins A.F., Barth A.L. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* // Braz. J. Microbiol. — 2016. — Vol. 47(4). — P. 785–792.
44. Pagano M., Martins A.F., Machado A.B., Barin J., Barth A.L. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal upstream *bla*_{OX4-51}-like gene in Porto Alegre: southern Brazil // Epidemiol. Infect. — 2012. — Vol. 141. — P. 1–4.
45. Partridge S.R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J.R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons // FEMS Microbiol. Rev. — 2009. — Vol. 33. — P. 757–784.
46. Pletz M.W., McGee L., Van Beneden C.A., Petit S., Bard-ley M., Barlow M. Fluoroquinolone resistance in invasive *Streptococcus pyogenes* isolates due to spontaneous mutation and horizontal gene transfer // Antimicrob. Agents Chemother. — 2006. — Vol. 50. — P. 943–948.
47. Poirel L., et al. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA // Antimicrob. Agents Chemother. — 2005. — Vol. 49. — P. 3523–3525.
48. Post V., White P.A., Hall R.M. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* // J. Antimicrob. Chemother. — 2010. — Vol. 65. — P. 1162–1170.
49. Prudhomme M., Attaiech L., Sanchez G., Martin B., Claverys J.P. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* // Science. — 2006. — Vol. 313. — P. 89–92.
50. Sibold C., Henrichsen J., Konig A., Martin C., Chalkley L., Hakenbeck R. Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis* // Mol. Microbiol. — 1994. — Vol. 12. — P. 1013–1023.
51. Smillie C., Garcillan-Barcia M.P., Francia M.V., Rocha E.P., de la Cruz F. Mobility of plasmids // Microbiol. Mol. Biol. — 2010. — Vol. 74. — P. 434–452.
52. Spratt B.G., Bowler L.D., Zhang Q.Y., Zhou J., Smith J.M. Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensal *Neisseria* species // J. Mol. Evol. — 1992. — Vol. 34. — P. 115–125.
53. Talebi M., Sadeghi J., Pourshafie M.R. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from intensive care units // Curr. Microbiol. — 2014. — Vol. 68(5). — P. 615–620.
54. Tamminen M., Virta M., Fani R., Fondi M. Large-scale analysis of plasmid relationships through gene-sharing networks // Mol. Biol. Evol. — 2012. — Vol. 29. — P. 1225–1240.
55. Thomas C.M., Nielsen K.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria // Nat. Rev. Microbiol. — 2005. — P. 3. — Vol. 711–721.
56. Von Wintersdorff C.J.H., Penders J., Van Niekerk J.M., Mills N.D., Majumder S., Van Alphen L.B., Savelkoul P.H.M., Wolfs P.F.G. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer // Frontiers in Microbiology. — 2016. — Vol. 7. — P. 173.
57. Zhu L., Yan Z., Zhang Z. Complete genome analysis of three *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in China for insight into the diversification of drug resistance elements // PLOS ONE. — 2013. — Vol. 8. — e66584.

MECHANISMS OF ACQUISITION BY MICROORGANISMS OF RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

N.V. GNENNAYA, I.S. SAZYKIN, M.A. SAZYKINA

Southern Federal University, Rostov-on-Don

Over the past few years, the world has seen a significant increase in the resistance of microorganisms to antimicrobial drugs, which is a serious obstacle to antibiotic therapy. The solution to the problem of antibiotic resistance is also complicated by the fact that antibiotic resistance genes (ARGs) are present even in microorganisms that have never previously been in contact with products of human activity. In this paper, a review of the literature on the main mechanisms of acquisition of resistance to antibiotics by microorganisms is presented.

Keywords: antibiotics, resistance mechanisms, antibiotic resistance, antibiotic resistance genes (ARGs).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК

А.В. ГИЛЬДЕБРАНТ*, И.С. САЗЫКИН, М.А. САЗЫКИНА

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии имени Д.И. Ивановского,
Ростов-на-Дону

Несмотря на широкое распространение биопленок и их вовлеченность во множество процессов, в том числе опасных для здоровья человека, до сих пор не существует стандартизированных методов их изучения. Разные подходы позволяют получить качественные или количественные данные в зависимости от целей, поставленных исследователем. В данном обзоре рассмотрены различные методы исследования биопленок — колориметрические, метаболические, генетические, а также физические. Обсуждены преимущества и недостатки описанных методов.

Ключевые слова: бактериальные биопленки, микроорганизмы, детекция образования биопленок.

Введение

Биопленки — сообщество микроорганизмов, прикрепленных к поверхности или границе раздела фаз, в котором клетки погружены в экзополимерный матрикс, состоящий из полисахаридов, белков и ДНК (Rabin et al., 2015) [28].

В природе биопленки играют роль в полезных взаимодействиях, включая симбиоз с другими организмами, такой как обрастание растительных тканей или колонизация кальмара люминесцентными бактериями *Aliivibrio fischeri* (ранее *Vibrio fischeri*) (Nyholm et al., 2000 [23]; Vais et al., 2004 [5]; Yaron, Romling, 2014 [42]). Но они могут играть и отрицательную роль, участвуя во многих хронических бактериальных инфекциях и промышленном биологическом обрастании (Hobley et al., 2015) [15]. Опасными для здоровья человека являются микроорганизмы, способные к образованию биопленок в медицинских устройствах постоянного назначения, таких как катетеры. Примером служит штамм *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающий внутрибольничные инфекции, которые сохраняются и после лечения антимикробными препаратами (Rybtke et al., 2015) [30].

Наиболее распространенные методы подсчета микроорганизмов подходят для изучения свободноплавающих (планктонных) форм. Однако большинство

микроорганизмов существует именно в форме биопленок (Branda et al., 2005) [8].

Несмотря на широкое распространение биопленок и их вовлеченность во множество процессов, подсчет точного количества бактерий в их составе до сих пор представляется большой проблемой. Учитывая сложность и гетерогенность биопленок, должна быть определена конкретная цель исследования. Подсчет общего числа бактериальных клеток, количества «живых бактерий», исследование экзополимерного матрикса — все это различные цели, требующие для успешной реализации применения разных методов (Pantarella et al., 2013) [25].

В связи с вышеизложенным в настоящем обзоре представлены современные методы исследования биопленок.

Колориметрические методы

Окрашивание генциановым фиолетовым. Это — один из первых методов, который был применен для количественной оценки биомассы биопленки (Christensen et al., 1985) [10]. Суть метода состоит в том, что отрицательно заряженные молекулы окрашиваются генциановым фиолетовым. Краситель связывается как с отрицательно заряженной поверхностью бактериальных клеток, так и с полисахаридами экзополимерного матрикса. После окрашивания связанный генциановый фиолетовый элюируется с помощью растворителя (этанола или уксусной кислоты). Количество растворенного красителя, измеренное при длине волны 570 нм, пропорционально биомассе биопленки (Stepanovic et al., 2000 [33]; Li, Yan, Xu, 2003 [20]). Преимуществами этого метода являются небольшая стоимость и простота выполнения. Тем не

© 2018 г. Гильдебрант А.В., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А.

* Автор для переписки:

Гильдебрант Анастасия Викторовна
младший научный сотрудник Южного федерального университета
344090 Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/2
E-mail: siniamida1@yandex.ru

менее данный метод дает характеристику лишь общей биомассе биопленки и никак не отражает количество живых микроорганизмов. Также к недостаткам относится низкая воспроизводимость — важными аспектами служат условия роста биопленок, природа и концентрация красителя и растворителя (Pantarella et al., 2013) [25].

Окрашивание флуоресцеиндиацетатом. Флуоресцеиндиацетат (FDA) — флуорогенный индикатор жизнеспособности бактериальных клеток. Он гидролизуется внутри- и внеклеточными эстеразами живых клеток до свободного флуоресцеина, при этом проявляя абсорбцию при 490 нм и интенсивную флуоресценцию (Honraet et al., 2005) [16]. Несмотря на невысокую стоимость и простоту выполнения, данный метод не нашел широкого применения, так как при окрашивании зрелой биопленки дает лишь полуколичественный результат (Tawakoli et al., 2013) [34].

Окрашивание 1,9-диметил-метиленовым синим (DMMB). Данный метод применим для окрашивания матрикса биопленки *Staphylococcus aureus*. DMMB образует нерастворимый продукт комплексообразования с сульфированными полисахаридами в матриксе биопленки. Количество красителя, высвободившегося после добавления раствора декомплексации, измеряется спектрофотометрически и отражает количество сульфированных полисахаридов, присутствующих в матриксе биопленки (Peeters et al., 2008) [26]. Данный метод экономичен и прост для выполнения. Однако существенным ограничением этого метода является его применимость лишь для небольшого числа микроорганизмов (для некоторых штаммов золотистого стафилококка), а также он не дает представления о количестве живых клеток. Ряд авторов комбинирует окрашивание DMMB с анализом с резазурином для подсчета количества живых бактерий в биопленке, что значительно усложняет анализ (Tote et al., 2008) [36].

LIVE/DEAD окрашивание. Метод основан на использовании двух красителей, один из которых окрашивает только живые клетки микроорганизмов, а другой — мертвые.

Для живых клеток одним из первых красителей являлся флуоресцеин диацетат. После внутриклеточного метаболизма он гидролизуется до флуоресцеина, который накапливается в клетке, излучая зеленый свет после возбуждения при 490 нм (Netuschil, 1983) [22]. Карбоксифлуоресцеин диацетат благодаря своему отрицательному заряду накапливается внутри клеток на более длительный срок (Leeder et al., 1989 [19]; Decker, 2001 [11]). Кальцеин АМ расщепляется внутриклеточными

эстеразами до флуоресцентного кальцеина. При этом он распределяется по всей клетке, включая ядра и митохондрии, излучая зеленый свет (пик эмиссии — 520 нм) (Liminga et al., 1999) [21]. Другие красители, такие как SYTO 17 или Syto 9 зеленый, основаны на внедрении в ДНК или РНК (Wojcik and Dobrucki, 2008) [40].

Одним из первых красителей для определения мертвых бактерий был бромистый этидий. Однако бромид этидия классифицируется как сильный мутаген и является генотоксичным (Singer et al., 1999) [32]. В качестве альтернативы выступают не проникающие через мембраны красители для нуклеиновых кислот SYTOX®. Эти красители не флуоресцируют в водных растворах, но при связывании с нуклеиновыми кислотами увеличивают флуоресценцию до 100 раз (Roth et al., 1997) [29]. Йодид пропидия также проникает только через поврежденные мембраны внутрь мертвых клеток (Tawakoli et al., 2013) [34].

Метаболические методы

Окрашивание резазурином. Резазурин — синий краситель, который поглощается клетками и восстанавливается до резозурина — высоко флуоресцентного соединения розового цвета, который свободно высвобождается из клеток. Необратимое восстановление резазурина до резозурина опосредовано внутриклеточными диафоразами. Сильный флуоресцентный сигнал резозурина служит хорошим показателем для оценки метаболической активности клеточной популяции. Резазурин-анализ является недорогим и нетоксичным методом при низких концентрациях и коротких периодах инкубации (<4 ч) (Uzarski et al., 2017) [37].

ХТТ анализ. Метод основан на восстановлении соли тетразолия — 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид (ХТТ) до формазана ХТТ митохондриальными дегидрогеназами, что приводит к колориметрическим изменениям, которые могут быть измерены при длине волны 490 нм. Для проведения анализа необходим электронный посредник — менадион (Li, Yan, Xu, 2003) [20]. Основные ограничения метода связаны со сложностью и гетерогенностью структуры и состава биопленки — в различных частях разная степень метаболической активности. Также зрелая биопленка имеет предрасположенность замедлять восстановление ХТТ и высвобождение формазана (Honraet et al., 2005) [16].

BioTimer анализ (BTA). В этом методе используется среда, содержащая феноловый красный (среда BT-

PR). Индикатор меняет свой цвет с красного на желтый в результате микробного метаболизма. Время, необходимое для изменения цвета индикатора, коррелирует с начальной концентрацией бактерий. Таким образом, время, требуемое для изменения цвета, определяет количество бактерий, присутствующих в образце, в нулевой момент времени через специфическую для рода корреляционную линию (Pantarella et al., 2008) [25]. Преимущества данного метода — он не требует проведения манипуляций с образцами, является недорогим и простым в использовании. Основным недостатком — сложность применения для изучения многовидовых биопленок в связи с различной скоростью роста микроорганизмов.

Генетические методы

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР широко применяется в качестве диагностического метода. При исследовании биопленок этот метод позволяет определить наличие генетических последовательностей, связанных с отдельными видами бактерий. Однако данный метод не подходит для количественных исследований биопленки, для определения жизнеспособных клеток (поскольку идет равномерная амплификация ДНК как живых, так и мертвых клеток). Также из-за высокой чувствительности можно получить ложноположительные результаты вследствие контаминации (Pantarella et al., 2013) [25]. Для преодоления этих проблем используется ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. В такой модификации флуоресцентный сигнал измеряется в реальном времени в каждом цикле амплификации и является прямо пропорциональным числу генерируемых ампликонов. Более того, так как в ПЦР амплифицируется вся ДНК, находящаяся в образце, в ОТ-ПЦР в реальном времени в качестве индикатора жизнеспособности клеток была предложена бактериальная мРНК, имеющая короткий период полураспада (Sheridan et al., 1998) [31]. Поэтому указанный метод применяется не только для обнаружения, но и для подсчета микроорганизмов в биопленке (Xie et al., 2011) [41]. Недостатками этого метода являются подготовка образца, который не должен иметь загрязнителей и/или ингибиторов ПЦР, а также выбор последовательностей праймеров. Другие ограничения метода связаны с высокой стоимостью и трудностью выполнения, требующего дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала (Pantarella et al., 2013) [25].

Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Этот метод является признанным инструментом для специфической и чувствительной идентифика-

ции целевых микроорганизмов в сложных микробных сообществах. FISH представляет собой генетический метод, в котором используются олигонуклеотидные зонды, помеченные флуоресцентными красителями. Зонды могут быть разработаны для связывания специфических молекул (Thurnheer et al., 2004) [35]. С помощью FISH можно обнаруживать живые, но некультивируемые бактерии или бактерии с низким уровнем метаболизма. Визуализировать результаты можно посредством сканирующей лазерной конфокальной микроскопии. Основные недостатки этого метода — он сложен в выполнении, занимает много времени и является дорогим. Также он обеспечивает высококачественные, но полуколичественные результаты.

Физические методы

Масс-спектрометрия. В этом методе изучаемое вещество облучается пучком электронов, так что все молекулы ионизируются с образованием газообразных ионов. Ионы затем разделяются в масс-спектрометре и характеризуются отношением массы к заряду и их относительным количеством. Данные представляют спектры масс, характерные для каждого соединения. MALDI-TOF масс-спектрометрия использовалась для оценки различных этапов развития биопленки *P. aeruginosa*. Метод оказался достаточно чувствительным для обнаружения фенотипических изменений по мере развития биопленки (Pereira et al., 2015) [27]. Эти методы дорогостоящие и требуют наличия передового оборудования и квалифицированного персонала.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). В данном методе используется световой микроскоп, оснащенный лазером, позволяющий сканировать толстый биологический образец, например, биопленку, считывая изображение по строкам, по осям X, Y и Z. Образцы часто окрашиваются флуоресцентным красителем, флуоресцентный свет от освещенного пятна собирается в объективе и трансформируется фотодиодом в электрический сигнал с помощью компьютера. Благодаря этому методу получается трехмерное изображение с высоким контрастом и разрешением (Pantarella et al., 2013) [25]. Этот метод широко используется для изучения биопленок, особенно для изучения компонентов экзополимерного матрикса (Carugianni et al., 2012) [18]. КЛСМ допускает только полуколичественное исследование.

Конфокальная рамановская микроскопия. Электромагнитный лазерный луч с известной длиной волны попадает на исследуемый образец. Измерив его рассеянное

излучение и сдвиг энергии, можно получить информацию о химических характеристиках образца (Chao and Zhang, 2012) [9]. Использование рамановской спектроскопии дает возможность получить химический «отпечаток пальца» различных биопленок. Однако исследование слоев внутри толщи биопленки является сложной задачей. Метод рамановской микроскопии может быть использован одновременно с КЛСМ (Wagner et al., 2009) [39].

Электронная микроскопия. Методы электронной микроскопии имеют высокое разрешение благодаря использованию высокоэнергетического электронного пучка.

Просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия (ПЭМ) обладает разрешением вплоть до 0,1 нм (Bergmans et al., 2005) [7]. ПЭМ — отличный метод визуализации бактерий и экзополимерного матрикса, но это трудоемкий и сложный метод, требующий приготовления ультратонких срезов (Allan-Wojtas et al., 2010) [4]. Также процедуры предварительной обработки, включая замораживание и фиксацию, могут изменить структуру биопленки или способствовать появлению артефактов (Chao and Zhang, 2012) [9].

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) позволяет визуализировать поверхностные структуры с трехмерным внешним видом при разных разрешениях. Однако из-за высокого вакуума, необходимого для изучения образцов, и из-за непроводящих свойств биологических образцов необходимы фиксация, дегидратация и покрытие проводящим материалом (Hannig et al., 2010) [14]. Эти ограничения частично преодолены с помощью крио-СЭМ и СЭМ объектов окружающей среды. В первом методе образцы быстро замораживаются, так что уязвимые структуры бактерий сохраняются. Второй метод обеспечивает визуализацию гидратированных непроводящих биопленок в газообразной среде (Alhede et al., 2012 [3]; Karcz et al., 2012 [17]).

Рентгеновская микроскопия. Это совокупность методов, в которых образец облучается рентгеновским излучением. Рентгеновские лучи благодаря малой длине волны проникают в образец на гораздо большую глубину, чем видимый свет. Рентгеновская микроскопия может достигать дифракционного предела разрешения порядка нескольких десятков нанометров и по теоретической величине разрешения находится между световой и электронной микроскопией (Лидер, 2017) [2]. Сканирующая рентгеновская микроскопия широко применяется для исследования состава бактериальных клеток и биопленок с номинальным разрешением 25 нм (Dynes et al., 2006 [13]; Benzerara et al., 2006 [6]). Данные методы требуют сложного и дорогого оборудования.

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ). В сканирующих зондовых микроскопах исследование микрорельефа поверхности проводится с помощью специальным образом приготовленных зондов в виде игл. В основе работы таких микроскопов лежат различные типы взаимодействия зонда с поверхностью. Среди методов СЗМ для исследования микробиологических образцов наиболее распространен метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). АСМ обеспечивает высокое разрешение вплоть до нанометровой шкалы, не разрушает образец и не требует какой-либо конкретной обработки образца. Благодаря этому АСМ применяется для визуализации поверхности бактерий и биопленок (Dufrene, 2001) [12]. Кроме того, данный метод позволяет изучать эластичность биопленок, а также их адгезию к наконечнику АСМ (Volle et al., 2008) [38]. При использовании комплексного подхода, включающего в себя три метода полуконтактного режима (полуконтактный, рассогласования, отображения фазы) и метод модуляции силы контактной АСМ с этапом наложения изображения, на примере *E. coli* и *S. aureus* проведен субморфологический анализ микроорганизмов и образуемой ими биопленки (Ерохин и др., 2012) [1].

Основное ограничение методов АСМ — возможность проанализировать только поверхность образца и близкий подповерхностный слой.

Заключение

Биопленка — сложное биологическое сообщество, ее изучение требует комплексного подхода. Как показал анализ литературных данных, для визуализации, количественной оценки биопленок, экзополимерного матрикса, жизнеспособности клеток, а также морфологических параметров биопленок используется достаточно большое количество разнообразных методов. Одного метода, позволяющего провести полный анализ биопленки, на данный момент не существует. Поэтому знание преимуществ и недостатков каждого из них будет весьма полезным для планирования экспериментов по изучению биопленок.

Источники финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках научного проекта № 6.2379.2017/ПЧ; при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-00787А; гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-9072.2016.11.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Ерохин П.С., Кузнецов О.С., Коннов Н.П., Видяева Н.А., Уткин Д.В. Комплексный подход к изучению биопленок микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. — 2012. — Т. 12(1). — С. 42–46.
2. Лидер В.В. Рентгеновская микроскопия // Успехи физических наук. — 2017. — Т. 187(2). — С. 201–219.
3. Alhede M., Quortrup K., Liebrechts R., Høiby N., Givskov M., Bjarndholt T. Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2012. — Vol. 65(2). — P. 335–342.
4. Allan-Wojtas P., Hildebrand P.D., Braun P.G., Smith-King H.L., Carbyn S., Renderos W.E. Low temperature and anhydrous electron microscopy techniques to observe the infection process of the bacterial pathogen *Xanthomonas fragariae* on strawberry leaves // J. Microsc. — 2010. — Vol. 239(3). — P. 249–258.
5. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production // Plant Physiol. — 2004. — Vol. 134(1). — P. 307–319.
6. Benzerara K., Miller V.M., Barell G., Kumar V., Miot J., Brown G.E., Lieske J.C. Search for microbial signatures within human and microbial calcifications using soft X-ray spectromicroscopy // J. Investig. Med. — 2006. — Vol. 54(7). — P. 367–379.
7. Bergmans L., Moisiadis P., Van Meerbeek B., Quirynen M., Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM // Int. Endod. J. — 2005. — Vol. 38(11). — P. 775–788.
8. Branda S.S., Vik Å., Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revisited // Trends Microbiol. — 2005. — Vol. 13(1). — P. 20–26.
9. Chao Y., Zhang T. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm // Anal. Bioanal. Chem. — 2012. — Vol. 404(5). — P. 1465–1475.
10. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices // J. Clin. Microbiol. — 1985. — Vol. 22(6). — P. 996–1006.
11. Decker E.M. The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci // Lett. Appl. Microbiol. — 2001. — Vol. 33(3). — P. 188–192.
12. Dufrene Y.F. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells // Micron. — 2001. — Vol. 32(2). — P. 153–165.
13. Dynes J.J., Tyliczszak T., Araki T., Lawrence J.R., Swerhone G.D., Leppard G.G., Hitchcock A.P. Speciation and quantitative mapping of metal species in microbial biofilms using scanning transmission X-ray microscopy // Environ. Sci. Technol. — 2006. — Vol. 40(5). — P. 1556–1565.
14. Hannig C., Follo M., Hellwig E., Al-Ahmad A. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques // J. Med. Microbiol. — 2010. — Vol. 59(1). — P. 1–7.
15. Hobbey L., Harkins C., MacPhee C.E., Stanley-Wall N.R. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes // FEMS Microbiol. Rev. — 2015. — Vol. 39(5). — P. 649–669.
16. Honraet K., Goetghebeur E., Nelis H.J. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms // J. Microbiol. Methods. — 2005. — Vol. 63(3). — P. 287–295.
17. Karcz J., Bernas T., Nowak A., Talik E., Woznica A. Application of lyophilization to prepare the nitrifying bacterial biofilm for imaging with scanning electron microscopy // Scanning. — 2012. — Vol. 34(1). — P. 26–36.
18. Karygianni L., Follo M., Hellwig E., Burghardt D., Wolke-witz M., Anderson A., Al-Ahmad A. Microscope-based imaging platform for large-scale analysis of oral biofilms // Appl. Environ. Microbiol. — 2012. — Vol. 78(24). — P. 8703–8711.
19. Leeder J.S., Dosch H.M., Harper P.A., Lam P., Spielberg S.P. Fluorescence-based viability assay for studies of reactive drug intermediates // Anal. Biochem. — 1989. — Vol. 177(2). — P. 364–372.
20. Li X., Yan Z., Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans* // Microbiology. — 2003. — Vol. 149(2). — P. 353–362.
21. Liminga G., Jonsson B., Nygren P., Larsson R. On the mechanism underlying calcein-induced cytotoxicity // Eur. J. Pharmacol. — 1999. — Vol. 383(3). — P. 321–329.
22. Netuschil L. Vital staining of plaque microorganisms using fluorescein diacetate and ethidium bromide // Dtsch. Zahnärztl. Z. — 1983. — Vol. 38(10). — P. 914–917.
23. Nyholm S.V., Stabb E.V., Ruby E.G., McFall-Ngai M.J. Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic vibrios from the environment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97(18). — P. 10231–10235.
24. Pantanella F., Valenti P., Frioni A., Natalizi T., Coltella L., Berlutti F. BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm // J. Microbiol. Methods. — 2008. — Vol. 75(3). — P. 478–484.

25. Pantanella F., Valenti P., Natalizi T., Passeri D., Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use // *Ann. Ig.* – 2013. – Vol. 25(1). – P. 31–42.
26. Peeters E., Nelis H.J., Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates // *J. Microbiol. Methods.* – 2008. – Vol. 72(2). – P. 157–165.
27. Pereira F.D., Bonatto C.C., Lopes C.A., Pereira A.L., Silva L.P. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces // *Microb Pathog.* – 2015. – Vol. 86. – P. 32–37.
28. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents // *Future.* – 2015. – Vol. 7(4). – P. 493–512.
29. Roth B.L., Poot M., Yue S.T., Millard P.J. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63(6). – P. 2421–2431.
30. Rybtke M., Hultqvist L.D., Givskov M., Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response // *J. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 427(23). – P. 3628–3645.
31. Sheridan G.E., Masters C.I., Shallcross J.A., Mackey B.M. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64(4). – P. 1313–1318.
32. Singer V.L., Lawlor T.E., Yue S. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test) // *Mutat. Res.* – 1999. – Vol. 439(1). – P. 37–47.
33. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation // *J. Microbiol. Methods.* – 2000. – Vol. 40(2). – P. 175–179.
34. Tawakoli P.N., Al-Ahmad A., Hoth-Hannig W., Hannig M., Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm // *Clin. Oral Investig.* – 2013. – Vol. 17(3). – P. 841–850.
35. Thurnheer T., Gmür R., Guggenheim B. Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm // *J. Microbiol. Methods.* – 2004. – Vol. 56(1). – P. 37–47.
36. Tote K., Vanden Berghe D., Maes L., Cos P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46(2). – P. 249–254.
37. Uzarski J.S., DiVito M.D., Wertheim J.A., Miller W.M. Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds // *Biomaterials.* – 2017. – Vol. 129. – P. 163–175.
38. Volle C.B., Ferguson M.A., Aidala K.E., Spain E.M., Núñez M.E. Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* – 2008. – Vol. 67(1). – P. 32–40.
39. Wagner M., Ivleva N.P., Haisch C., Niessner R., Horn H. Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): investigations on EPS-Matrix // *Water Res.* – 2009. – Vol. 43(1). – P. 63–76.
40. Wojcik K., Dobrucki J.W. Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells—influence on chromatin organization and histone-DNA interactions // *Cytometry A.* – 2008. – Vol. 73(6). – P. 555–562.
41. Xie Z., Thompson A., Kashleva H., Dongari-Bagtzoglou A. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms // *BMC Microbiol.* – 2011. – Vol. 11(1). – P. 93.
42. Yaron S., Römling U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence // *Microb. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 7(6). – P. 496–516.

METHODS OF BACTERIAL BIOFILMS STUDY

A.V. GILDEBRANT, I.S. SAZYKIN, M.A. SAZYKINA

Southern Federal University, D.I. Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology, Rostov-on-Don

Despite the wide distribution of biofilms and their involvement in a variety of processes, including ones dangerous for human health, there are still no standardized methods for studying them. Various approaches make it possible to obtain qualitative or quantitative data depending on the goals set by the researcher. In this review various methods of studying biofilms - colorimetric, metabolic, genetic and also physical are considered. The advantages and disadvantages of the described methods are considered.

Keywords: bacterial biofilms, microorganisms, detection of biofilm formation.

БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ: ОБЗОР

Е.К. ГЛАДЫШЕВА*, Е.А. СКИБА

ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН», Бийск

В обзоре представлены питательные среды, применяемые для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы в мировой практике. Приведены данные о влиянии состава питательных сред на целлюлозосинтезирующую способность микроорганизмов и на свойства полученных образцов бактериальной наноцеллюлозы.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, продуцент, синтетическая питательная среда, отходы пищевых производств, целлюлозосодержащее сырье.

Введение

В настоящее время бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) востребована во многих отраслях промышленности. Это объясняется свойствами БНЦ, отличными от растительной целлюлозы. Высокий модуль Юнга делает БНЦ идеальным материалом для акустических датчиков диафрагм [34], дает возможность использовать ее в качестве фильтровальных мембран [50] и получать на ее основе бумагу с повышенной прочностью [56]. Повышенная влагоудерживающая способность, нетоксичность, отсутствие побочных реакций делает возможным использовать БНЦ в косметической промышленности [34]. Влажные целлюлозные мембраны БНЦ — это нанопористый материал, который позволяет дозированно вносить антибиотики или другие лекарства в рану; в то же время он выступает как эффективный физический барьер для защиты раны от инфекций. Из-за значительной биосовместимости БНЦ обладает достаточным потенциалом для использования в биомедицинских областях [2, 49].

Востребованность БНЦ создала предпосылки не только для широкой исследовательской практики, но и для технологических разработок и интегрирования производства БНЦ в биоэкономику [21]. В этой связи важным аспектом является научное обоснование выбора питательной среды. В настоящем обзоре приводится

анализ влияния на биосинтез БНЦ различных источников углерода, а также рассматриваются натуральные питательные среды, предложенные для использования в получении БНЦ.

Среды

Как и любая полноценная питательная среда, среда, предназначенная для биосинтеза БНЦ, должна содержать в достаточном количестве источники углерода, азота и фосфора. Известная с 1954 годов стандартная питательная среда Хестрина — Шрэмма, соответствует этим требованиям и имеет следующий состав: глюкоза — 2,0%; пептон — 0,5%; дрожжевой экстракт — 0,5%; ди-натрий фосфат (безводный) — 0,27%; лимонная кислота (моногидрат) — 0,115%; рН доводят до 6,0 с помощью разбавленных растворов соляной кислоты или гидроксида натрия [24]. Многочисленные исследования посвящены модификациям данной питательной среды с помощью использования других источников углерода и азота, добавления стимулирующих добавок, повышающих выход БНЦ. Например, в работе [20] исследовано влияние различных источников углерода (глюкоза, фруктоза, сахароза и этанол) и азота (дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и сульфата аммония) на биосинтез БНЦ, синтезируемой продуцентом *Acetobacter lovaniensis* НВВ5. Наибольший выход БНЦ получен при использовании в качестве источника углерода глюкозы, в качестве источника азота — дрожжевого экстракта. В питательной среде, состоящей из 2% глюкозы и 0,5% дрожжевого экстракта, выход сухой БНЦ составил 0,040 г/л через 7 дней культивирования. Таким образом, для данного штамма предпочтительными оказались традиционные источники углерода и азота.

© 2018 г. Гладышева Е.К., Скиба Е.А.

* Автор для переписки:

Гладышева Евгения Константиновна
младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии,
ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий»
СО РАН

E-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

Однако для штамма *Gluconacetobacter sp.* RV28 наиболее предпочтительным источником углерода является сахароза. Выход БНЦ, полученный на питательной среде, содержащей сахарозу, составил 2,3 г/л. Исследования показали, что источник углерода влияет на выход БНЦ, но не оказывает влияния на ее молекулярную структуру [33].

В работе [38] выявлено, что для штамма *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53524, кроме сахарозы, предпочтительным источником является глицерин. Выход БНЦ на питательных средах, содержащих сахарозу и глицерин, составил 3,83 и 3,75 г/л соответственно. Исследования методом ЯМР показали, что независимо от источника углерода БНЦ обладала высокой степенью кристалличности.

Культивирование продуцента *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245 на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода глицерин, позволило получить БНЦ с выходом 28,7%. Тем не менее в этом исследовании отмечено некоторое снижение степени кристалличности для образца БНЦ, синтезированного на указанной питательной среде: образцы БНЦ, синтезированные на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу и фруктозу, имели степень кристалличности 88% и 86%, на среде, содержащей глицерин — 78% [31].

Штамм *Acetobacter xylinum* 1FO 13693 может синтезировать БНЦ с высоким выходом на питательных средах, содержащих в качестве источника углерода, как традиционную глюкозу, так и нетрадиционные фруктозу и глицерин [36]. Продуцент *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 синтезировал БНЦ с меньшим выходом на питательной среде, содержащей глицерин в качестве источника углерода, чем на питательной среде, в которой использовалась сахароза [53].

В работе [48] питательные среды, содержащие разные источники углерода, были модифицированы добавлением в качестве источника азота — кукурузного экстракта. Исследования методом рентгеноструктурного анализа показали, что все образцы БНЦ имели близкие размеры кристаллитов и состояли преимущественно из фазы I α . Однако степень кристалличности образцов БНЦ при использовании различных питательных сред значительно отличалась: от 50 до 95%.

Оптимизация условий культивирования для продуцента *Acetobacter xylinum* VPR2001 с помощью статистического анализа позволила получить БНЦ с выходом 14 г/л после 72 часов при использовании питательной среды, содержащей 4,99% фруктозы, 2,85%

кукурузного экстракта, 28,33% растворенного кислорода и 0,38% агара [15].

Исследование зависимости выхода БНЦ от содержания в питательной среде пептона и дрожжевого экстракта показало, что концентрация дрожжевого экстракта, обеспечивающего наибольший выход БНЦ, составляет 7 г/л, пептона — 9 г/л. При этом выход БНЦ составил 11,65 г/л [45]. Дрожжевой экстракт в питательных средах служит источником азота и аминокислот. Однако использование дрожжевого экстракта повышает стоимость питательной среды. В работе [33] предложено использовать гидролизат рыбного порошка в качестве источника азота и аминокислот. Опыты показали, что 15 г/л гидролизата рыбного порошка в питательной среде увеличивает объемный выход до 3,0 г/л.

Изучение процесса биосинтеза БНЦ продуцентом *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* на синтетических питательных средах с добавлением различных стимулирующих компонентов продемонстрировало, что присутствие в питательной среде лактата в динамических условиях культивирования дает возможность повысить выход БНЦ приблизительно в 4–5 раз. Это объясняется тем, что молочная кислота ускоряет цикл Кребса, а также является хорошим энергетическим источником, в результате чего ускоряется рост клеток и повышается выход БНЦ [37].

Есть данные, что на биосинтез БНЦ положительно влияет добавление в питательную среду этанола [8, 39, 44, 51]. Этанол подавляет спонтанное образование мутантов, не способных к биосинтезу БНЦ (Cel-мутанты). Такие мутации могут появляться при динамических условиях культивирования. Кроме того, этанол может использоваться как дополнительный источник углерода. Так, для *Gluconacetobacter hansenii* выход БНЦ увеличивается от 1,30 до 2,31 г/л при добавлении 1% этанола [44]. Для *Acetobacter sp.* A9 добавление 1,4% этанола в питательную среду увеличивает выход БНЦ на 400% (до 15,2 г/л), что примерно в 4 раза больше, чем на питательной среде, не содержащей этанол [51]. По другим сведениям, добавление 1% этанола к стандартной питательной среде увеличивает выход БНЦ в 10 раз [8]. Однако исследования методом растровой электронной микроскопии показали, что добавление этанола изменяет сетчатую структуру БНЦ на более плоскую структуру с тонкими микрофибриллами [39].

На выход БНЦ влияет присутствие в питательной среде гептагидрата сульфата магния. Установлен оптимальный состав питательной среды для биосинтеза БНЦ: 1,5% глюкозы; 0,2% сульфата аммония; 0,3%

дигидрофосфата калия; 0,3% гидрофосфата натрия; 0,08% гептагидрата сульфата магния; 0,0005% сульфата железа (II); 0,0003% борной кислоты; 0,00005% никотинамида; 0,6% этанола. Максимальный выход БНЦ (4,16 г/л) получен через 8 дней культивирования при перемешивании 200 об/мин [52].

Проведен биосинтез БНЦ продуцентом *Acetobacter xylinum* NUST4.1 на стандартных питательных средах с добавлением альгината натрия и без него. Установлено, что при добавлении в питательную среду альгината натрия масса БНЦ достигает 6 г/л; при этом масса БНЦ в контрольном опыте составляет 3,7 г/л. Рентгенографические исследования установили снижение степени кристалличности у образца БНЦ, синтезированного на питательной среде с добавлением альгината натрия [59].

Для штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) наибольший выход БНЦ (12,3 г/л) получен на синтетической питательной среде со следующим составом: 30 г сахарозы, 1 г густого кокосового молока, 5 г дрожжевого экстракта, 2,7 г Na_2HPO_4 , 2 г K_2HPO_4 , 3 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,15 г моногидрата лимонной кислоты, 10 мл спирта (98%), 7,5 мл уксусной кислоты (70%) на 1000 мл воды [12].

Таким образом, можно сделать вывод, что для разных продуцентов предпочтительными являются разные источники углерода и азота, разные стимулирующие компоненты, обеспечивающие наибольший выход БНЦ; поэтому для каждого продуцента необходимо экспериментальным путем подбирать составы питательных сред. Более того, состав питательных сред влияет не только на выход БНЦ, но и на ее физико-химические свойства. Так как представленные данные о влиянии состава питательной среды на молекулярную структуру противоречивы, необходимо при подборе питательных сред исследовать структуру полученных образцов. Перечисленные варианты синтетических питательных сред позволяют выяснить влияние различных компонентов на биосинтез БНЦ и оптимизировать состав питательных сред. Однако такие среды имеют высокую стоимость, что повышает себестоимость конечного продукта, в связи с чем целесообразен поиск более дешевых питательных сред.

Применение отходов пищевых производств является одним из путей снижения стоимости питательных сред. В России начаты отдельные исследования по решению проблемы поиска дешевой питательной среды для биосинтеза БНЦ. Предложено использование в качестве источника углерода в питательных средах сахаросодержащих отходов сахарного производства [1, 5, 10, 47],

нестандартного сырья плодово-ягодных производств [4], нативной молочной сыворотки [6], послеспиртовой зерновой барды [7]. Выход БНЦ на питательной среде послеспиртовой зерновой барды составил 7 г/л [9], при добавлении 1% глицерина к питательной среде послеспиртовой зерновой барды выход БНЦ увеличивается до 9 г/л [1].

В Японии [14] в качестве источника углерода для биосинтеза БНЦ предложено использовать мелассу, обработанную серной кислотой. Показано, что скорость биосинтеза и выход БНЦ были максимальными при концентрациях редуцирующих веществ 23 г/л и 37 г/л; кроме того, снижался синтез побочных продуктов (по сравнению с концентрациями 48 и 72 г/л). Выход БНЦ на питательной среде из свекловичной мелассы выше [30], чем на стандартной питательной среде [24]. Культивирование продуцента *Acetobacter xylinum* KJ1 [40] на осажаренных пищевых отходах показало незначительное снижение степени кристалличности образцов БНЦ от 89,7% (стандартная питательная среда [24]) до 84,1% (ферментативный гидролизат осажаренных пищевых отходов).

Известно об использовании в качестве питательной среды некондиционных фруктов и подсырной сыворотки, как отдельно, так и вместе в разных сочетаниях. Наибольший выход БНЦ был получен на питательной среде, состоящей из некондиционных фруктов [29]. Рентгенографические исследования установили высокую степень кристалличности для образца БНЦ, синтезированного на питательной среде из некондиционных фруктов.

Культивирование штамма *Gluconacetobacter xylinus* (РТСС) 1734 на гомогенизированном экстракте некондиционных фруктов показало увеличение выхода БНЦ в 1,5–2 раза по сравнению с питательной средой, содержащей сахарозу в качестве источника углерода. Исследование методом инфракрасной спектроскопии выявило необходимые совпадения, которые доказали, что данная целлюлоза имеет бактериальную природу. Методом рентгенографических исследований констатировано, что степень кристалличности образца БНЦ, полученного на гомогенизированном экстракте некондиционных фруктов, составила 61% [41].

Проведен биосинтез БНЦ продуцентом *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 на питательных средах из фруктовых соков. Установлено, что соки из апельсина и японской груши — наиболее подходящие питательные среды для биосинтеза БНЦ [32].

Описано использование сточных вод от производства рисового вина вместо дистиллированной воды

в стандартной питательной среде [24] для биосинтеза БНЦ [55]. Полная замена дистиллированной воды на сточные воды от производства рисового вина повышает выход БНЦ до 10,38 г/л, что в 2,5 раза больше, чем применение стандартной питательной среды с дистиллированной водой.

Известно о питательной среде для биосинтеза БНЦ, в которой в качестве источника углерода используют кленовый сироп со следующим составом: кленовый сироп — 30 г/л, сульфат аммония — 3,3 г/л, дигидрофосфат калия — 1 г/л, дрожжевой экстракт — 20 г/л, лимонная кислота — 1,6 г/л, тринатрия цитрат безводный — 2,4 г/л, этанол — 0,5% (об/об), уксусная кислота — 0,5 г/л, гептагидрат сульфата магния — 0,8 г/л [58].

В работе [17] в качестве дешевого источника углерода предложено использовать экстракт виноградной кожицы и подсырную сыворотку. Наибольшее количество БНЦ получено на питательной среде экстракта виноградной кожицы — 0,6 г/л через 96 часов культивирования.

В Аргентине исследован процесс биосинтеза БНЦ продуцентом *Glucanacetobacter xylinus* на питательных средах из виноградной мезги (отхода от производства вина) [54]. Выход БНЦ на питательной среде, содержащей виноградную мезгу в качестве источника углерода и кукурузный экстракт в качестве источника азота, составил 8,0 г/л. С помощью рентгенографических исследований установлено, что в образце БНЦ, синтезированной на питательной среде из виноградной мезги, преобладала триклинная модификация I α , а степень кристалличности составила от 74 до 79%.

Сообщалось об использовании для биосинтеза БНЦ питательной среды, в состав которой входят отходы от производства кофе и крахмалоперерабатывающей промышленности. Данная питательная среда имеет следующий состав: рН — 6,64, кукурузный экстракт — 10%, этанол — 0,5%, уксусная кислота — 1,13%, соотношение воды и шелухи кофе (1:1). Через 2 недели культивирования выход БНЦ составил 6,24 г/л [46].

В работе [35] для биосинтеза БНЦ были использованы засахаренные сточные воды (отход от производства мармелада). Объемный выход БНЦ на данной питательной среде составил 2,25 г/л. Исследования с помощью электронной микроскопии продемонстрировали, что средний диаметр волокон полученного образца БНЦ был равен 5,9 нм.

Несмотря на высокие показатели выхода БНЦ на питательных средах, полученных на основе отходов пищевых производств, их применение проблематично, так

как производство бактериальной целлюлозы становится зависимым от функционирования смежного предприятия, а отходы — это всегда скоропортящееся сырье и технически сложно соблюдать сроки его доставки. Скоропортящееся сырье требует введения дополнительной стадии стерилизации питательной среды для избежания контаминации посторонней микрофлорой, что усложняет способ получения БНЦ технологически (требуется дополнительное оборудование и электроэнергия) и ведет к повышению себестоимости готового продукта.

Поиск источников углерода

Масштабирование процесса и реализация на практике биотехнологического производства зависят от таких факторов, как: наличие воспроизводимого массового дешевого сырья; простота трансформации сырья в питательную среду; возможность аппаратурного оформления производства стандартным, либо новым эффективным оборудованием; высокий выход целевого продукта и обеспечение стандартности его качества. Ввиду перспективности использования БНЦ в различных отраслях промышленности для создания крупномасштабного промышленного производства важной задачей является поиск подходящих источников углерода, имеющих низкую стоимость и не конкурирующих с пищевой продукцией. Всем перечисленным критериям в полной мере соответствует целлюлозосодержащее сырье: энергетические (быстрорастущие) растения, отходы агропромышленного комплекса (солома, плодовые оболочки злаков, кожура и жом плодовых культур и т.д.), отходы деревопереработки. Целлюлоза является одним из наиболее распространенных полисахаридов и рассматривается как неисчерпаемый и универсальный источник. По экспертным оценкам, в ближайшем будущем такое сырье станет основным для ряда биотехнологических производств [42]. В последние 15 лет достигнуты значительные успехи в данной области, связанные с фундаментальным изучением химического строения растительного сырья [43], методов его химической предварительной обработки [16, 28], изучением механизма ферментативных превращений целлюлозы в раствор глюкозы и созданием новых, эффективных ферментных препаратов [3, 11, 13]. Эти успехи необходимо учитывать при разработке технологических подходов к получению питательных сред из целлюлозосодержащего сырья, предназначенных для биосинтеза БНЦ.

В России известно об использовании гидролизатов растений, промышленных гидролизатов древесины, торфа, щелоков целлюлозно-бумажного производства в качестве питательных сред для биосинтеза БНЦ [4].

В Португалии [17] в качестве дешевого источника углерода предложены сульфитные щелока и отходы промышленного производства глицерина. Выход БНЦ на сульфитных щелоках составил 0,3 г/л, на отходах промышленного производства глицерина — 0,1 г/л через 96 часов культивирования. В качестве питательной среды глицерин использован и в работе [54], при этом глицерин рассматривается как отход в производстве биодизельного топлива. Выход БНЦ составил 10,0 г/л, рентгенографические исследования установили, что в образцах БНЦ преобладает триклинная модификация $\text{I}\alpha$ и степень кристалличности составила 76%.

Культивирование продуцента *Gluconacetobacter xylinus* СН001 на кислотном гидролизате энергетического растения мискантуса дало возможность получить БНЦ с выходом 6,4 г/л через 14 суток [57]. Кислотный гидролизат, полученный обработкой мискантуса серной кислотой, был детоксицирован с помощью избыточной извести. Исследования методами инфракрасной спектроскопии и рентгеновской дифракции показали высокий потенциал БНЦ как материала для дальнейшего применения.

В работе [26] сообщено об использовании в качестве сырья порошка травы аморфофалуса. Порошок травы аморфофалуса подвергали воздействию серной кислоты с последующей детоксификацией для удаления ингибиторов роста продуцента БНЦ. Процесс детоксификации полученного кислотного гидролизата включал в себя: добавление гидроксида кальция или гидроксида натрия до получения значения уровня активной кислотности 10; доведение рН до 5; последующее восстановление с активированным углем или лакказой. Выход БНЦ на кислотном гидролизате после детоксификации увеличился в три раза по сравнению с синтетической глюкозной средой и в 5 раз — по сравнению со средой, содержащей маннозу.

Кислотный гидролизат древесины ели использовали в качестве питательной среды для биосинтеза БНЦ. Предварительно гидролизат древесины ели был детоксицирован двенадцатью различными методами. Наибольший выход БНЦ получен на гидролизате, детоксицированном с помощью активированного угля, и составил 8,2 г/л [23].

В работе [27] для биосинтеза БНЦ использован кислотный гидролизат соломы пшеницы, а для удаления

ингибиторов гидролизат обрабатывали различными щелочами, включая гидроксид кальция, гидроксид натрия и аммиак, а также их комбинации с активированным углем или лакказой. Выход БНЦ на кислотных гидролизатах, полученных из соломы пшеницы, обработанной гидроксидом кальция и активированным углем, повысился на 50%.

При использовании гидролизных сред, полученных путем ферментативного гидролиза, операция детоксификации не требуется. Так, авторами [19] проведен биосинтез БНЦ на ферментативном гидролизате соломы пшеницы. Выход БНЦ был выше, чем на стандартной питательной среде [24].

Авторами [22] проведен биосинтез БНЦ на ферментативном гидролизате плодовых оболочек риса продуцентом *Acetobacter xylinum* АТСС 23769. Выход БНЦ на ферментативном гидролизате плодовых оболочек риса выше, чем на стандартной питательной среде [24]; однако при этом рентгенографические исследования полученных образцов БНЦ показали снижение степени кристалличности с 56% (на стандартной питательной среде) до 28% (на ферментативном гидролизате плодовых оболочек риса).

Штамм *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973 культивировали на ферментативных гидролизатах шрота подсолнечника (отход от производства биодизеля в Южной Европе) и отрубей пшеницы (отход мукомольного и кондитерского производства). Выход БНЦ на ферментативном гидролизате шрота подсолнечника составил 13,3 г/л через 15 дней культивирования, что в 4 раза больше, чем на питательной среде, в которой глюкоза была заменена на глицерин. Выход БНЦ на ферментативном гидролизате отрубей пшеницы составил 13,0 г/л. Исследования методом электронной микроскопии показали, что образцы БНЦ, синтезированные на ферментативных гидролизатах шрота подсолнечника и отрубей пшеницы, имеют слоистую неорганизованную структуру [53].

Хлопковые отходы текстильной промышленности подвергали ферментативному гидролизу. Выход БНЦ на ферментативных гидролизатах хлопковых отходов текстильной промышленности составил 10,8 г/л, что на 83% выше, чем выход БНЦ на стандартной питательной среде [25].

В работе [18] в качестве питательных сред для биосинтеза БНЦ используются ферментативные гидролизаты двух видов целлюлоз: сульфатной и сульфитной. Объемный выход БНЦ на ферментативном гидролизате сульфатной целлюлозы составил 11 г/л, сульфитной целлюлозы — 10 г/л. Рентгенографические исследо-

вания обнаружили снижение степени кристалличности образцов БНЦ, синтезированных на ферментативных гидролизатах (60,6 и 66,3% соответственно) по сравнению со стандартной питательной средой (78%).

В таблице 1 представлен выход БНЦ при использовании кислотных и ферментативных гидролизатов различных видов целлюлозосодержащего сырья в качестве питательной среды.

Таблица 1

Выход и степень кристалличности образцов БНЦ

Сырье, способ получения гидролизата	Продуцент	Выход БЦ, г/л	Степень кристалличности, %	Источник
Стандартная питательная среда Хестрина – Шрэмма	<i>Acetobacter xylinum</i>	0,52	78	[24]
Мискантус, кислотный гидролизат	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> CH001	6,40	99,0	[57]
Аморфофаллус, кислотный гидролизат	<i>Acetobacter aceti</i> subsp. <i>xylinus</i> ATCC 23770	0,13	–	[26]
Древесина ели, ферментативный гидролизат	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770	8,20	–	[23]
Шрот подсолнечника, ферментативный гидролизат	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> DSM 15973	13,3	74,0	[53]
Отруби пшеницы, ферментативный гидролизат	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> DSM 15973	13,0	89,0	[53]
Солома пшеницы, ферментативный гидролизат	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770	8,2	–	[19]
Плодовые оболочки риса, ферментативный гидролизат	<i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 23769	2,42	28,0	[22]
Хлопковые отходы, ферментативный гидролизат	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770	10,8	–	[25]
Сульфатная целлюлоза, ферментативный гидролизат	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770	11,0	60,6	[18]
Сульфитная целлюлоза, ферментативный гидролизат	<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770	10,0	66,3	[18]

Анализ представленных в таблице 1 данных показывает, что выход БНЦ может варьировать от 6,3 до 80% на разных питательных средах из целлюлозосодержащего сырья. Сравнение затруднено, так как во всех случаях используются не только разные питательные среды, но и разные продуценты. Следует отметить, что образцы БНЦ, полученные на разных питательных средах из целлюлозосодержащего сырья, имеют степень кристалличности, изменяющуюся в диапазоне от 28 до 99%. Большой разброс в диапазонах выходов и степени кристалличности БНЦ свидетельствует о неоднозначности полученных результатов. Питательные среды из ферментативных гидролизатов недревесного возобновляемого целлюлозосодержащего сырья имеют сложный состав, при приготовлении питательных сред используются разные подходы, при биосинтезе — разные продуценты. Поэтому успешное протекание процесса биосинтеза БНЦ не очевидно, для создания устойчивой

технологии требуется глубокий инжиниринг на каждой технологической стадии. Представленные данные показывают высокий интерес к поиску дешевых питательных сред для биосинтеза БНЦ. Состав питательных сред влияет не только на выход БНЦ, но и на физико-химические свойства полученных образцов.

Заключение

Обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы по вопросам исследований биосинтеза БНЦ показал, что в настоящее время питательные среды для биосинтеза БНЦ, применяемые в мировой практике, условно можно разделить на синтетические, натуральные из отходов пищевых производств и альтернативные среды из целлюлозосодержащего сырья.

Для разных продуцентов предпочтительными служат разные источники углерода и азота, разные сти-

мулирующие компоненты, обеспечивающие наибольший выход БНЦ. Исследования и оптимизация синтетических питательных сред позволяют выяснить влияние различных компонентов, повысить выход БНЦ и получить БНЦ с заданными качественными характеристиками, однако использование синтетических питательных сред очень дорого.

Одним из путей снижения стоимости питательных сред является использование отходов пищевых производств. Несмотря на высокие показатели выхода БНЦ на питательных средах, полученных на основе отходов пищевых производств, их применение проблематично, так как отходы — это всегда скоропортящееся сырье с варьирующими химическим и биологическим составами. Кроме того, производство бактериальной целлюлозы будет зависеть от функционирования смежного предприятия, что неблагоприятно с экономической точки зрения.

Производство БНЦ из целлюлозосодержащего сырья наиболее перспективно. Это — массовое, устойчивое, ежегодно воспроизводимое в промышленных масштабах сырье, устойчивое в хранении, имеющее низкую стоимость и не конкурирующее с пищевой продукцией. В литературе есть примеры, позволяющие получать БНЦ с выходом до 80% и со степенью кристалличности до 99%. Для успешной реализации сложнейшего биотехнологического процесса получения БНЦ из легко возобновляемого целлюлозосодержащего сырья требуется глубокая инженерная проработка каждой технологической стадии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Литература

1. Богатырева А.О., Сапунова Н.Б., Цанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальных экзополисахаридов на средах с отходами биотехнологических производств // Вестник Казанского технологического университета. — 2016. — Т. 19. — № 24. — С. 142–145.
2. Громовых Т.И., Садыкова С.С., Луценко С.В., Дмитриенко А.С., Фельдман Н.Б., Данильчук Т.Н., Каширин В.В. Бактериальная целлюлоза, синтезируемая *Glicopacetobacter hansenii*, для использования в медицине // Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — Т. 53. — № 1. — С. 69–75.
3. Дедков В.Н., Гнеушева И.А., Павловская Н.Е. Использование биопрепарата «Байкал ЭМ-1» для биоконверсии соломы яровой мягкой пшеницы // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2013. — Т. 9. — № 4. — С. 33–37.
4. Пат. 2141530 Россия, МПК C12P19/02, C12N1/20. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinum* для получения бактериальной целлюлозы / А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко. — № 98108987/13; заявлено 05.05.1998; опубл. 20.11.1999.
5. Пат. 2189394 Россия, МПК C12P19/04, C12N1/20, C12R1/02. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinum* для получения бактериальной целлюлозы (варианты) / А.К. Хрипунов, А.А. Ткаченко. — № 98100669/13; заявлено 12.01.1998; опубл. 20.08.2000, Бюл. № 26 — 16 с.
6. Пат. № 2536257 Россия, МПК C12N1/20, C12R1/01. Способ получения бактериальной целлюлозы / В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, М.И. Назаркина, Н.В. Киреев. — № 2013127538/10; заявлено 17.06.2013; опубл. 20.12.2014. Бюл. № 35 — 4 стр.
7. Пат. № 2536973 Россия, МПК C12N1/20, C12P19/04, C12R1/01. Способ получения бактериальной целлюлозы / В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, М.И. Назаркина. — № 2013154403/10; заявл. 06.12.2013; опубл. 27.12.2014. Бюл. № 36 — 6 стр.
8. Петухова Н.И., Колобова С.А., Назмутдинова Р.Р., Зорин В.В. Синтез целлюлозы изолятами уксуснокислых бактерий из «Чайного гриба» // Башкирский химический журнал. — 2016. — Т. 23. — № 1. — С. 7–13.
9. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И., Богатырева А.О., Цанкин М.В. Получение бактериальной целлюлозы на отходах пищевой промышленности // Актуальная биотехнология. — 2014. — № 3. — С. 112.
10. Сапунова Н.Б., А.О. Богатырева, Цанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальной целлюлозы на среде с мелассой // Вестник Казанского технологического университета. — 2016. — Т. 19. — № 24. — С. 154–156.
11. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Скомаровский А.А., Кондратьева Е.Г., Осипов Д.О., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матыс В.В., Кошелев А.В., Бубнова Т.В., Берлин А.Х. Новые препараты целлюлаз для высокоэффективного осахаривания лигноцеллюлозных материалов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 2. — С. 11–15.
12. Фан Ми Хань, Громовых Т.И. Получение бактериальной целлюлозы микробиологическим синтезом // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. — 2012. — № 5. — С. 67–58.
13. Agrawal R., Satlewal A., Gaur R., Mathur A., Kumar R., Gupta R.P., Tuli D.K. Pilot scale pretreatment of wheat straw and comparative evaluation of commercial enzyme preparations

- for biomass saccharification and fermentation // *Biochemical Engineering Journal*. – 2015. – Vol. 102. – P. 54–61.
14. *Bae S., Shoda M.* Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium // *Biotechnology Progress*. – 2004. – Vol. 20(4). – P. 1366–1371.
 15. *Bae S., Shoda M.* Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2005. – Vol. 90(2). – P. 20–28.
 16. *Brodeur G., Yau E., Badal K., Collier J., Ramachandran K.B., Ramakrishnan S.* Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review // *Enzyme Research*. – 2011. – Vol. 2011. – Article ID 787532. – 17 p.
 17. *Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D.* Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102(15). – P. 7354–7360.
 18. *Cavka A., Guo X., Tang S.J., Winstrand S., Jonsson L.J., Hong F.* Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge // *Biotechnology for Biofuels*. – 2013. – Vol. 6. – P. 25. doi: 10.1186/1754-6834-6-25.
 19. *Chen L., Hong F., Yang X.X., Han S.F.* Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism // *Bioresource Technology*. – 2013. – Vol. 135. – P. 464–468.
 20. *Çoban E.P., Biyik H.* Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5 // *African Journal of Biotechnology*. – 2011. – Vol. 10(27). – P. 5346–5354.
 21. *Gama M., Dourado F., Bielecki S.* Bacterial nanocellulose from biotechnology to bio-economy. – Elsevier B.V., 2016. – 241 p.
 22. *Goelzer F.D.E., Faria-Tischer P.C.S., Vitorino J.C., Sierakowski M.R., Tischer C.A.* Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark // *Materials Science and Engineering*. – 2009. – Vol. 29(2). – P. 546–551.
 23. *Guo X., Cavka A., Jönsson L.J., Hong F.* Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production // *Microbial Cell Factories*. – 2013. – Vol. 12. – P. 93. doi: 10.1186/1475-2859-12-93.
 24. *Hestrin S., Schramm M.* Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // *Journal of Biochemistry*. – 1954. – Vol. 58(2). – P. 345–352.
 25. *Hong F., Guo X., Zhang S., Han S., Yang G., Jonsson L.J.* Bacterial cellulose production from cotton based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment // *Bioresource Technology*. – 2012. – Vol. 104. – P. 503–508.
 26. *Hong F., Qiu K.* An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770 // *Carbohydrate Polymers*. – 2008. – Vol. 72(3). – P. 545–549.
 27. *Hong F., Zhu Y.X., Yang G., Yang X.X.* Wheat straw acid hydrolysate as a potential cost-effective feedstock for production of bacterial cellulose // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 86(5). – P. 675–680.
 28. *Hu F., Ragauskas A.* Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry // *Bioenergy Research*. – 2012. – Vol. 5(4). – P. 1043–1066.
 29. *Jozala A.F., Pértile R.A.N., Santos dos C.A., Carvalho Santos-Ebinuma de V., Seckler M.M., Gama F.M., Pessoa A. Jr.* Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 99(3). – P. 1181–1190.
 30. *Keshk S., Razeq T.M.A., Sameshima K.* Bacterial cellulose production from beet molasses // *African Journal of Biotechnology*. – 2006. – Vol. 5(17). – P. 1519–1523.
 31. *Keshk S., Sameshima K.* Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production // *African Journal of Biotechnology*. – 2005. – Vol. 4(6). – P. 478–482.
 32. *Kurosumi A., Sasaki C., Yamashita Y., Nakamura Y.* Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – Vol. 76(2). – P. 333–335.
 33. *Lee K.-Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A.* More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // *Macromolecular Bioscience*. – 2014. – Vol. 14(1). – P. 10–32.
 34. *Lin S.-P., Calvar I.L., Catchmark J.M., Liu J.-R., Demirci A., Cheng K.-C.* Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose // *Cellulose*. – 2013. – Vol. 20(5). – P. 2191–2219.
 35. *Li Z., Wang L., Hua J., Jia S., Zhang J., Liu H.* Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum* // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – Vol. 120. – P. 115–119.
 36. *Masaoka S., Ohe T., Sakota N.* Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum* // *Journal of Fermentation and Bioengineering*. – 1993. – Vol. 7(1). – P. 18–22.
 37. *Matsuoka M., Tsuchida T., Matsushita K., Adachi O., Yoshinaga F.* A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sacrofermentans*

- // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. — 1996. — Vol. 60(4). — P. 575–579.
38. Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524 // Journal of Applied Microbiology. — 2009. — Vol. 107(2). — P. 576–583.
 39. Mohammadkazemi F., Doosthoseini K., Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734) // Cellulose Chemistry and Technology. — 2015. — Vol. 49(5–6). — P. 455–462.
 40. Moon S.H., Park J.M., Chun H.Y., Kim S.J. Comparisons of physical properties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using saccharified food wastes // Biotechnology and Bioprocess Engineering. — 2006. — Vol. 11(1). — P. 26–31.
 41. Moosavi-Nasab M., Yousefi A.R. Investigation of physicochemical properties of the bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* from date syrup // World Academy of Science, Engineering and Technology. — 2010. — Vol. 4(8). — P. 613–618.
 42. Mussatto S.I., Dragone G., Guimaraes P.M.R., Silva J.P.A., Carneiro L.M., Roberto I.C., Vicente A., Domingues L., Teixeira J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production // Biotechnology Advances. — 2010. — Vol. 28(6). — P. 817–830.
 43. Octave S., Thomas D. Biorefinery: toward an industrial metabolism // Biochimie. — 2009. — Vol. 91(6). — P. 659–664.
 44. Park J.K., Jung J.Y., Park Y.H. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol // Biotechnology Letters. — 2003. — Vol. 25(24). — P. 2055–2059.
 45. Pourramezan G.Z., Roayaei A.M., Qezelbash Q.R. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2 // Biotechnology. — 2009. — Vol. 8(1). — P. 150–154.
 46. Rani M.U., Navin K.R., Appaiah K.A.A. Statistical optimization of medium composition for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk extract — an agro-industry waste // Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2011. — Vol. 21(7). — P. 739–745.
 47. Revin V., Liaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using food industry by-products // Journal of Biotechnology. — 2015. — Vol. 208. — P. S117.
 48. Ruka D.R., Simon G.P., Dean K.M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose // Carbohydrate Polymers. — 2012. — Vol. 89(2). — P. 613–622.
 49. Schumann D., Wippermann J., Klemm D., Kramer F., Koth D., Kosmehl H., Wahlers T., Salehi-Gelan S. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes // Cellulose. — 2009. — Vol. 16(5). — P. 877–885.
 50. Shibasaki H., Kuga S., Onabe F. Mechanical properties of papersheet containing bacterial cellulose // Japan Tappi Journal. — 1994. — Vol. 48(12). — P. 1621–1630.
 51. Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* // Biotechnology and Applied Biochemistry. — 2001. — Vol. 33(1). — P. 1–5.
 52. Son H.J., Kim H.G., Kim K.K., Kim H.S., Kim Y.G., Lee S.J. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions // Bioresource Technology. — 2003. — Vol. 86(3). — P. 215–219.
 53. Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams // International Journal of Molecular Sciences. — 2015. — Vol. 16(7). — P. 14832–14849.
 54. Vazquez A., Foresti M.L., Cerrutti P., Galvagno M. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus* // Journal of Polymers and the Environment. — 2013. — Vol. 21(2). — P. 545–554.
 55. Wu J.M., Liu R.H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* // Carbohydrate Polymers. — 2012. — Vol. 90(1). — P. 116–121.
 56. Yamanaka S., Watanabe K., Kitamura N., Iguchi M., Mitsuhashi S., Nishi Y., Uryu M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose // Journal of Materials Science. — 1989. — Vol. 24(9). — P. 3141–3145.
 57. Yang X.-Y., Huang C., Guo H.-J., Xiong L., Li Y.-Y., Zhang H.-R., Chen X.-D. Bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) acid hydrolysate to bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* // Journal of Applied Microbiology. — 2013. — Vol. 115(4). — P. 995–1002.
 58. Zeng X., Small D.P., Wan W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup // Carbohydrate Polymers. — 2011. — Vol. 85(3). — P. 506–513.
 59. Zhou L.L., Sun D.P., Hu L.Y., Li Y.W., Yang J.Z. Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. — 2007. — Vol. 34(7). — P. 483–489.

BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE ON ALTERNATIVE NUTRIENT MEDIA: REVIEW

E.K. GLADYSHEVA, E.A. SKIBA

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the RAS, Biysk

This review reports nutrient media commonly used worldwide for the biosynthesis of microbial cellulose. The effect the composition of nutrient media on the cellulose producibility of microorganisms and on the properties of the resultant microbial cellulose samples is presented.

Keywords: bacterial nanocellulose, culture, synthetic nutrient media, food industry wastes, cellulosic feedstock.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА СПОРО- И НЕСПОРООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

С.С. БОЙКО^{1*}, Е.С. ЯЦЕНКО²

¹ Алтайский государственный университет, биологический факультет,

² Инжиниринговый центр «Промбиотех» АлтГУ, Барнаул

Изучено влияние ультразвука на спорообразующие бактерии: споры и вегетативные клетки. Показано также влияние ультразвука на неспорообразующие микроорганизмы. Выявлен ингибирующий и стимулирующий эффект при облучении ультразвуком. Полученные результаты могут представлять определенный интерес для других исследователей.

Ключевые слова: спорообразующие бактерии, неспорообразующие бактерии, стимуляция, ингибирование, ультразвук.

Одной из приоритетных задач современной микробиологии являются вопросы целенаправленного воздействия определенными факторами (физическими, химическими и др.) на бактерии с целью модификации их биологических свойств.

Из литературных источников известно, что воздействие некоторых абиотических факторов может вызывать определенные адаптивные изменения биологических свойств бактерий, но влияние именно физических факторов на живые микроорганизмы изучено еще недостаточно. Особого внимания заслуживают ультразвуковые и низкоинтенсивные электромагнитные волны [2].

Несмотря на то, что ультразвук (УЗ) давно используют в различных отраслях науки, техники, медицины, его влияние на микроорганизмы требует более детального изучения. Ультразвуковые волны обладают большой механической энергией и вызывают ряд физических, химических и биологических явлений. Поэтому не случаен интерес к изучению влияния и механизмам действия этого физического фактора на биологические объекты [3].

Целью исследования было изучение влияния ультразвукового воздействия на спорообразующие и неспорообразующие бактерии на примере *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-8054, *Lactobacillus paracasei* В-625З, *Pseudomonas fluorescens* АР-33.

В работе были применены следующие материалы и методы. В качестве исходных штаммов использовали: *Lactobacillus paracasei* В-625З, *Pseudomonas fluorescens* АР-33, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-8054.

Для выращивания, поддержания и хранения культуры спорообразующих бактерий использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): агар-агар — 18, дрожжевой экстракт — 5, пептон — 15, хлорид натрия — 5, дистиллированная вода — до 1 л (рН 6,8–7,0). Для культивирования спорообразующих бактерий использовали вегетативную среду (г/л): дрожжевой экстракт — 5, пептон — 15, хлорид натрия — 5, дистиллированная вода — до 1 л (рН 6,8–7,0). Для *Lactobacillus paracasei* В-625З была использована среда состава: гидролизованное молоко — 1000 мл; дрожжевой автолизат — 3%; агар — 3% (рН 6). При культивировании *Pseudomonas fluorescens* АР-33 использовалась среда Кинг В.

Готовые среды стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин при давлении 1,1 кгс/см². Исследования проводились в двух объемах: 1 мл и 50 мл.

Для изучения влияния ультразвука на споры использовались пробирки микроцентрифужные (Эппендорфа) объемом 1 мл, содержащие 0,1 г спор исследуемого штамма. Из обработанных спор готовили споровую суспензию с вегетативной средой. Культуру выращивали в колбах в шейкер-инкубаторе «Innova 44».

При оценке влияния ультразвука на споровую суспензию в вегетативной среде использовались пробирки микроцентрифужные объемом 1 мл, содержащие 0,1 г исследуемых спор и 1 мл вегетативной среды, и колбы Эрленмейера объемом 50 мл, содержащие 5 г исследуемых спор и 50 мл вегетативной среды. После внесения питательной

© 2018 г. Бойко С.С., Яценко Е.С.

* Автор для переписки:

Бойко Светлана Сергеевна

магистр биологического факультета Алтайского государственного университета

E-mail: sv.boyk@mail.ru

среды и спор озвучивали полученные суспензии. Время воздействия составляло 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 минут. После озвучивания микроорганизмы культивировались в течение суток в шейкер-инкубаторе «Innova 44».

Изучение влияния ультразвука на выбранные микроорганизмы проводили в двух объемах: 1 мл и 50 мл. Выраженную культуру с вегетативной средой переносили в пробирки микроцентрифужные (Эппендорфа) в объеме 1 мл и в колбу в объеме 50 мл. После озвучивания микроорганизмы культивировались в течение суток в шейкер-инкубаторе «Innova 44».

Культивирование микроорганизмов проводилось в шейкер-инкубаторе «Innova 44» (New Brunswick Scientific, США) при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37 °С для *Lactobacillus paracasei* В-625З, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-8054 и при 130 об/мин, температуре 28 °С — для *Pseudomonas fluorescens* AP-33 [6].

Воздействие ультразвуком проводили при температуре 32 °С, частоте колебаний 37 кГц и мощности 140 Вт в течение 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 минут.

В качестве контрольной пробы использовали штаммы *Lactobacillus paracasei* В-625З, *Pseudomonas fluorescens* AP-33, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-8054 без воздействия ультразвуком.

Для выявления результата использовался метод посева на питательные среды (чашечный метод). Сущность метода заключается в посеве определенного объема из серии десятикратных разведений суспензии исследуемых микроорганизмов на плотную питательную среду, инкубации и подсчете образовавшихся колоний, учитывая, что каждая колония — результат размножения одной жизнеспособной клетки микроорганизма.

Эффективность действия ультразвука (ΔT) в процентах к контролю оценивалась по сравнению числа колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл суспензии, выросших на поверхности среды в контроле и опыте.

Величину ΔT рассчитывали по формуле:

$$\Delta T = \frac{t1 - t0}{t0} \times 100\%,$$

где t_0 — количество КОЕ в контроле, t_1 — количество КОЕ в опыте.

Испытания велись в лаборатории инжинирингового центра «Промбиотех» Алтайского государственного университета.

Были получены следующие результаты. Исследование велось в несколько этапов.

На первом этапе было изучено влияние ультразвука на споровые бактерии *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-8054.

В ходе исследования было установлено, что при озвучивании сухих спор в течение 1 минуты достигается максимальное достоверное стимулирующее действие с $\Delta T=67\%$ для *Bacillus subtilis* и $\Delta T=65\%$ для *Bacillus licheniformis*. Также было выявлено стимулирующее действие ультразвука на споры *Bacillus subtilis* в вегетативной среде, однако для разных используемых объемов время озвучивания, при котором происходит увеличение КОЕ по сравнению с отрицательным контролем, различно. Так, для объема 1 мл наибольшее достоверное стимулирование происходит при воздействии ультразвуком в течение 20 минут и $\Delta T=75\%$, а для объема 50 мл — 5 минут, где $\Delta T=25\%$.

При воздействии ультразвуком на споры *Bacillus licheniformis* в вегетативной среде получены аналогичные результаты: максимальное достоверное стимулирование происходит при озвучивании ультразвуком в течение 15 минут с $\Delta T=50\%$. При озвучивании суспензии *Bacillus subtilis* в вегетативной среде отмечено подавление роста бактерий по сравнению с отрицательным контролем и $\Delta T= -60\%$, также для суспензии *Bacillus licheniformis* в вегетативной среде с $\Delta T= -55\%$.

На втором этапе было изучено влияние ультразвукового облучения на неспорообразующие микроорганизмы на примере *Lactobacillus paracasei* В-625З и *Pseudomonas fluorescens* AP-33. При озвучивании суспензий микроорганизмов, предварительно выращенных в течение 24 часов в шейкер-инкубаторе, происходит подавление роста бактерии с $\Delta T= -27\%$ для *Lactobacillus paracasei* и с $\Delta T= -94\%$ — для *Pseudomonas fluorescens*.

Ультразвуковая обработка может приводить как к гибели, так и к стимуляции физиологического состояния клетки и ускорению обмена между клеткой и средой, в которой содержатся все необходимые для нее питательные вещества [4]. Разрыв клеточных мембран и нарушение механической целостности клеток — пожалуй, наиболее очевидное из возможных последствий ультразвукового облучения. При прохождении в среде обитания клеток акустической волны в ней создаются переменные во времени механические напряжения, и если их амплитуда достаточно высока, то клетка может просто не выдержать такого сильного воздействия и ее мембрана разорвется [5].

Действие ультразвуковых волн не сводится только к механическим повреждениям клеток. В результате ульт-

тразвукового воздействия наблюдаются биохимические и функциональные изменения, не приводящие к гибели организма. Так, под воздействием УЗ могут высвобождаться в клетке биологически активные вещества (витамины, ферменты и др.), а также появляться не характерные для микроорганизма ферменты: у *Saccharomyces globosus* после 30 мин воздействия УЗ частотой в 740 кГц появляется инвертаза, отсутствующая у неозвученных клеток, изменяется чувствительность к антибиотикам — у *S. haemoliticus*, подвергнутого воздействию ультразвука частотой в 800 кГц в течение 10 мин, чувствительность к пенициллину возрастает в 2–5 раз [1].

Механическая резистентность одноклеточных заметно меняется в зависимости от их величины, формы, особенностей строения, периода и жизненного цикла и т.д. В первую очередь, резистентность клеток к ультразвуку определяется структурой их оболочки, в наибольшей степени подверженной влиянию факторов, действующих в ультразвуковом поле.

По результатам проведенных испытаний можно сделать заключение, что стимулирующее действие ультразвукового облучения происходит только для микроорганизмов, находящихся в состоянии споры. Это обусловлено строением споры. Как известно, наружная оболочка споры состоит из полипептидов, под которой располагается кора (кортекс), состоящая из многослойного пептидогликанового остова (мурейна — нерастворимого структурного компонента). Каркас споры отличается от каркаса стенок вегетативных клеток не только строением и составом, но и степенью сшивки. Споровые покровы в основном состоят из белков и в небольшом количестве — из липидов и гликолипидов. Белки покровов обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям и обеспечивают спорам защиту от действия литических ферментов, других повреждающих факторов, а также предохраняют споры от преждевременного прорастания. Оказалось, что споры мутантов, лишенные покровов, прорастают сразу же после выхода из материнской клетки, даже если условия для последующего роста неблагоприятны. Специфические элементы споры, включая многослойную оболочку и дипиколинат кальция, обуславливают ее свойства: она долго может сохраняться в почве, например, возбудители сибирской язвы и столбняка — десятки лет. В благоприятных условиях они прорастают, проходя три стадии: активацию, инициацию, вырастание. При этом из одной споры образуется одна бактерия. Активация — готовность к прорастанию. Она ускоряется при прогревании при температуре 60–80 °С. Инициация прорастания

длится несколько минут. Выращивание характеризуется быстрым ростом, сопровождающимся разрушением оболочки споры и выходом проростка.

Также различие в ингибирующем действии ультразвука на вегетативные клетки можно объяснить различием в строении грамположительных (*Lactobacillus paracasei*) и грамотрицательных (*Pseudomonas fluorescens*) бактерий. Клеточная стенка грамположительных бактерий — толстая, несложно организованная клеточная стенка, в составе которой преобладают пептидогликан и тейхоевые кислоты, нет липополисахаридов (ЛПС), часто нет диаминопимелиновой кислоты. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий значительно тоньше, содержит ЛПС, липопротеины, фосфолипиды, диаминопимелиновую кислоту. Устроена более сложно — имеется внешняя мембрана, поэтому клеточная стенка трехслойная [7].

В результате проведенного исследования сделаны такие выводы:

- изучено влияние ультразвукового воздействия на спорообразующие и неспорообразующие бактерии на примере *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-8054, *Lactobacillus paracasei* В-625Э, *Pseudomonas fluorescens* АР-33;
- установлено, что при озвучивании сухих пор в течение 1 мин достигается максимальное достоверное стимулирующее действие;
- выявлено стимулирующее действие ультразвука на споры *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* в вегетативной среде;
- при озвучивании микроорганизмов, не находящихся в состоянии споры, отмечено ингибирующее действие ультразвука.

Литература

1. Акопян Б.В., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами / Под ред. д.т.н., профессора С.И. Щукина. — Издательство МГТУ имени Н.Э. Баумана, 2005.
2. Антушева Т.И., Бабич Е.М., Кивва Ф.В. и др. Влияние ультразвука и электромагнитных волн миллиметрового диапазона на адгезивные свойства *C. diphtheriae* // Успехи современного естествознания. — 2014. — № 3. — С. 48–52.
3. Антушева Т.И. Некоторые особенности влияния ультразвука на микроорганизмы // Живые и биокосные системы. — 2013. — № 4. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-4/article-11>.

4. Бигаева А.В., Соколов Т.А., Файзулаев Я.Н. Изучение влияния ультразвуковой обработки дрожжей на сбраживание яблочного сусла // Сборник материалов конференций в 6 ч. / Под общ. ред. А.А. Тихомирова — М.: МГУПП. — 2016. — С. 13–16.
5. Демин И.Ю., Прончатов-Рубцов Н.В. Современные акустические методы исследований в биологии и медицине. Учебно-методический материал по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах». — Нижний Новгород, 2007. — 121 с.
6. Савушкин В.А., Джавахия В.В. и др. Разработка высокоактивного штамма-продуцента вирджиниамицина и повышение его продуктивности с помощью синтетических абсорбирующих смол // Биологический вестник МДПУ имени Богдана Хмельницкого. — 2016. — № 6(3). — С. 198.
7. Центер И.М. Эффективность обеззараживания поверхности высокочастотным ультразвуком // Вестник Бурятской сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. — 2013. — №2(31). — С. 74–78.

STUDY OF THE INFLUENCE OF ULTRASOUND ON SPORE AND NON-SPORE FORMING BACTERIA

S.S. BOYKO¹, E.S. YATSENKO²

¹ *Altai State University, Faculty of Biology,*

² *Engineering Center «Prombiotech» Altai State University, Barnaul*

The effect of ultrasound on spore-forming bacteria — spores and vegetative cells — was studied. The effect of ultrasound on nonspore-forming microorganisms is also shown. An inhibitory and stimulating effect was revealed in ultrasound irradiation. The obtained results may be of some interest to other researchers.

Keywords: spore-forming bacteria, non-spore forming bacteria, stimulation, inhibition, ultrasound.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2018 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1883 — открыт фагоцитоз И.И. Мечниковым.

1883 — Вильгельм Ру высказал предположение о линейном расположении в хромосомах наследственных факторов: хроматиновых зерен («ид» — по Вейсману).

1883 — Август Вейсман сформулировал теорию непрерывности зародышевой плазмы.

1888 — В. Вальдейер предложил термин «хромосома».

1893 — открытие нитрифицирующих бактерий (С.Н. Виноградский).

1908 — Арчибалд Гаррод (Великобритания) впервые выдвинул предположение о связи между генами и ферментами (в 1941 г. это показали Бидл и Тейтем: один ген — один фермент).

1913 — выход в свет книги Уильяма Бэтсона «Проблемы генетики» (англ. яз.).

1913 — А. Стертевант (будучи студентом) в лаборатории Т. Моргана впервые построил карту расположения генов (установил порядок генов в X-хромосоме).

1913 — усовершенствование Каррелем метода культуры клеток.

1923 — присуждение Нобелевской премии Ф.Г. Бантингу, Дж. Маклеоду за открытие инсулина.

1923 — открытие Бриджесом транслокаций у дрозофилы.

1928 — публикация статьи Н.К. Кольцова о принципе самоудвоения наследственной молекулы в немецком журнале «*Biologisches Zentralblatt*».

1928 — английский микробиолог Ф. Гриффит (1877–1941) установил, что непатогенный штамм пневмококка может трансформироваться в патогенный

с помощью трансформирующего фактора (О.Т. Эйвери в 1944 году показал, что это — ДНК).

1928 — открытие А. Флемингом пенициллина.

1933 — получение Т.Х. Морганом Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие функций хромосом как носителей наследственности.

1938 — появление термина «молекулярная биология». Авторство традиционно приписывают американскому математику Уоррену Виверу (Warren Weaver, 1894–1978).

1943 — С. Лурия и М. Дельбрюк показали, что бактерии содержат спонтанно мутирующие гены (их эксперимент получил название «флуктуационный тест»). Публикация: Luria S. and Delbrueck M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // *Genetics*. — 1943. — Vol. 28. — P. 491–511.

1953 — публикация в «*Nature*» статьи Дж. Уотсона и Ф. Крика о структуре ДНК: Watson J.D. & Crick F.H.C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature*. — 1953. — Vol. 171(4356). — P. 737–738.

1953 — вручение Нобелевской премии Хансу Кребсу за открытие цикла лимонной кислоты (совместно с Ф. Липманом).

1958 — получение Нобелевской премии по физиологии и медицине Дж.У. Бидлом и Э.Л. Тейтемом за открытия, касающиеся роли генов в специфических биохимических процессах (половинная премия). Другая половина премии была присуждена Дж. Ледербергу за открытия, касающиеся генетической рекомбинации у бактерий и структуры их генетического аппарата.

1968 — присуждение Нобелевской премии за расшифровку генетического кода М. Ниренбергу, Х.Г. Коране, Р. Холли.

1973 — С. Коэн и Г. Бойер — первый рекомбинантный организм.

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

1973 — первая беременность после оплодотворения в пробирке.

1978 — компания Генентех объявила об успешном лабораторном синтезе человеческого инсулина с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

1983 — присуждение Нобелевской премии Барбаре МакКлинток (1902–1992) за открытие транспозирующих (мобильных) генетических систем.

1983 — открытие полимеразной цепной реакции (ПЦР) К. Мюллисом (фирма «Cetus»), который за это был удостоен Нобелевской премии (1993).

1983 — выделение вируса СПИДа в нескольких лабораториях США и Европы.

1983 — создание метода конструкции фрагментов ДНК длиной от 5 до 75 пар оснований (М. Carruthers, Колорадский университет). Затем была разработана автоматическая установка (совместно с L. Hood из Калифорнийского технологического института).

1983 — основание Научно-образовательного центра в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина АН СССР (ныне — Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

1988 — основан Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information — NCBI), являющийся частью Национальной медицинской библиотеки США и отделом Национальных институтов здоровья.

1993 — создана Ассоциация биотехнологической промышленности («The Biotechnology Industry Organization»).

1993 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Р. Дж. Робертсу и Ф.А. Шарпу за открытие прерывистой структуры (расщепленности) генов.

1998 — расшифрован геном червя *Caenorhabditis elegans*. Первая публикация в «Science» в декабре 1998 г. Полное завершение проекта в 2002 г.

2003 — полная расшифровка генома человека.

2003 — основание Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова.

ПЕРСОНАЛИИ

155 лет со дня рождения В.И. Вернадского (1863–1945).

135 лет со дня рождения немецкого биохимика Отто Варбурга (1883–1970), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1931 г. за открытие природы и механизма действия дыхательного фермента.

130 лет со дня рождения и 45 лет со дня смерти Э.А. Ваксмана (1888–1973). Родился на территории дореволюционной России, в 1911 г. эмигрировал в США. Открыл стрептомицин, за что был удостоен Нобелевской премии в 1952 г.

120 лет со дня рождения и 50 лет со дня смерти Х.У. Флори (1898–1968). За открытие пенициллина ему совместно с А. Флемингом и Э. Чейном в 1945 г. была присуждена Нобелевская премия.

115 лет со дня рождения шведского биохимика А.Х.Т. Теорелля (1903–1982). Нобелевская премия 1955 г. за открытия, касающиеся природы и способа действия окислительных ферментов.

115 лет со дня рождения американского генетика Дж.У. Бидла (1903–1989). Нобелевская премия 1958 г. по физиологии и медицине (половинная совместно с Э. Тейтемом; вторая половина была присуждена Дж. Ледербергу).

115 лет со дня рождения американского генетика Дж. Снелла (1903–1996), первооткрывателя МНС, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1980 года (совместно с Ж. Доссе и Б. Бенасерафом).

115 лет со дня рождения А.А. Прокофьевой-Бельговской (1903–1984), известного отечественного цитогенетика.

110 лет со дня рождения американского биохимика Алфреда Херши (1908–1997), автора одного

из ключевых экспериментов в молекулярной биологии (1952). Нобелевская премия по физиологии и медицине 1969 г. (вместе с М. Дельбрюком и С. Лурия).

100 лет со дня рождения и 5 лет со дня смерти Фредерика Сенгера (1918–2013), выдающегося английского биохимика. Дважды Нобелевский лауреат по химии: 1958 г. — за исследование структуры белков, прежде всего инсулина; 1980 г. — половинная премия вместе с У. Гилбертом за вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах (другая половина была вручена Полу Бергу за рекомбинантную ДНК).

100 лет со дня рождения Эдвина Кребса (1918–2009). Нобелевская премия 1992 г. (совместно с Эдмондом Фишером) за открытие обратимого фосфорилирования белков — не путать с Хансом Кребсом, первооткрывателем одноименного цикла (трикарбоновых кислот).

100 лет со дня рождения Артура Корнберга (1918–2007), выдающегося американского биохимика, лауреата Нобелевской премии 1959 г. (совместно с С. Очоа) за исследования механизма биосинтеза РНК и ДНК.

90 лет со дня рождения Дж. Уотсона (род. в 1928 г.), автора (вместе с Ф. Криком) феноменального открытия в молекулярной биологии (открытия XX века) — двойной спирали ДНК. Нобелевский лауреат 1962 г. (совместно с Ф. Криком и М. Уилкинсом).

90 лет со дня рождения Даниела Натанса (1928–1999). Нобелевская премия 1978 г. за откры-

тие ферментов рестрикции (совместно с В. Арбером и Г. Смитом).

80 лет со дня рождения американского биохимика Дэвида Балтимора (род. в 1938 г.). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1975 года (совместно с Р. Дульбекко и Х.М. Теминим) за открытия, касающиеся взаимодействия между онкогенными вирусами и генетическим материалом клетки.

75 лет со дня рождения Ричарда Дж. Робертса (род. в 1943 г.), лауреата Нобелевской премии 1993 г. (совместно с Ф.А. Шарпом) за открытие прерывистой структуры (расщепленности) генов.

75 лет со дня смерти Н.И. Вавилова (1887–1943), выдающегося отечественного биолога, генетика, селекционера.

30 лет со дня смерти Ю.А. Овчинникова (1934–1988), крупного отечественного молекулярного биолога, вице-президента АН СССР.

25 лет со дня смерти Северо Очоа (1905–1993), испанца по происхождению, известного энзимолога, лауреата Нобелевской премии 1959 г. (совместно с А. Корнбергом).

25 лет со дня смерти американского биохимика Роберта Холли (1922–1993), удостоенного Нобелевской премии в 1968 году за расшифровку генетического кода (совместно с М. Ниренбергом и Х.Г. Кораной).

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2018 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

**XXX зимняя молодежная научная школа
«Перспективные направления физико-
химической биологии и биотехнологии»
(Москва, 12–15 февраля 2018 г.)**

12–15 февраля 2018 года в Москве, в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова состоялась XXX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Это мероприятие уже давно стало традиционным, а в этом году оно было приурочено к 30-летию его основания академиком Ю.А. Овчинниковым. Он знал и любил молодежь и хорошо понимал ее роль в обеспечении преемственности знаний, а главное — в сохранении эмоционального заряда на научный поиск, стойкой мотивации к открытию новых путей в науке, здорового юношеского самолюбия и соревновательности.



В связи с указанной памятной датой с докладами выступили те, кто близко знал Ю.А. Овчинникова — В.Т. Иванов, Е.Д. Свердлов, В.М. Липкин, А.И. Мирошников, Р.Г. Василов и др.

Повестка дня четырехдневного мероприятия была очень насыщенной и охватывала широкий спектр тематики молекулярно-биологических исследований, включая геномику, протеомику, биоинформатику, нейробиологическое направление и т.д. Всего состоялось 7 заседаний, на которых были заслушаны доклады теоретического и экспериментального характера.

В работе школы принял участие президент Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова профессор Р.Г. Василов. Он выступил с сообщением «Состояние и перспективы развития биотехнологии в России и за рубежом». Свой доклад он разделил на две части. В первой части он остановился на главных направлениях развития современной биотехнологии в мире в контексте новых технологий, во второй — коснулся конкретного развития биотехнологии в России. Р.Г. Василов подчеркнул основополагающую роль академика Ю.А. Овчинникова в становлении биотехнологии в СССР, указав на его целенаправленную деятельность по организации теории и практики биотехнологии в стране.

В первой части сначала была освещена тема «Биотехнология и глобальные вызовы», в рамках которой были рассмотрены актуальные экологические, технологические и иные проблемы. Затем были обсуждены место и значение биотехнологии в современном мире. В частности, было уделено внимание биоэкономике как интегральному научно-практическому направлению. Далее были проанализированы геномные технологии XXI века, области применения биотехнологии и геномных технологий, в том числе применительно к медицине, фармацевтике, сельскому хозяйству, пищевой индустрии, промышленности, энергетике, сделан акцент на вопросы биорефайнинга (глубокой переработки биомассы), искусственных молекулярных машин, нейронных сетей, цифровизации и т.д.

Во второй части доклада Р.Г. Василова «Биотехнология в России» данные были преподнесены в историческом контексте в увязке с современными очередными задачами развития биотехнологии. При этом было указано на рывок в биотехнологиях, который был сделан в СССР благодаря консолидированной позиции руководителей государства и науки. Особенно была раскрыта решающая роль активного взаимодействия Ю.А. Овчинникова как вице-президента АН СССР и В.Д. Беляева как руководителя Главмикробиопрома, которые вместе способствовали ускоренному развитию биотехнологии как государственного приоритета № 1. Был приведен также большой материал о той деятельности, которая ведется в наши дни в сфере биотехнологии.

Состоялся традиционный конкурс молодых ученых, итоги которого подвела на заключительной сессии Т.В. Овчинникова, сообщив имена победителей и осуществив церемонию их награждения.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 28.03.18
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 7,0. Тираж 1000 экз.

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

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru