

**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: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василов* 4

Оригинальные статьи

Современные методические приемы очистки холерного токсина.

Л.П. Алексеева, О.А. Якушева, В.П. Зюзина, О.В. Дуванова, Е.С. Шипко, Р.В. Писанов..... 5

Определение оптимальной среды и условий глубинного культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, А.В. Лушников, О.А. Маркина 10

Исследование взаимодействия алюминия с *Callitriche palustris* в условиях пресноводных экспериментальных систем.

В.А. Поклонов 17

Разработка метода введения в культуру клеток и регенерации растений декоративных видов льна (*Linum grandiflorum*, *Linum perenne*).

И.И. Ташлиева, Е.А. Гладков..... 22

Биобезопасность урбаноземов. Перспективы совершенствования диагностики и профилактики токсокароза.

О.Б. Жданова, С.П. Ашихмин, Л.А. Написанова, Е.С. Ключкина, А.Г. Мешандин,

В.С. Болдырев, С.Ю. Богословский 25

Влияние пробиотического препарата на основе *Bacillus subtilis* на микробное сообщество кишечника крыс.

Е.В. Скворцов, Риш. С. Мухаммадиев, Рин. С. Мухаммадиев, Л.Р. Валиуллин 30

Продукты ферментативного гидролиза глюкановых и хитиновых цепей хитин-глюкановых сополимеров из биомассы микромицетов.

Н.Ю. Шарова, Б.С. Манжиева..... 36

Обзоры

Туляремийные бактериофаги и перспективы их использования.

А.О. Кочеткова, Н.Е. Гаевская, Н.В. Павлович, М.П. Погожова..... 42

Применение атомно-силовой микроскопии в изучении ультраструктуры клеток эукариот.

П.С. Ерохин, С.В. Генералов, Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, Е.Г. Абрамова, Н.А. Осина 47

Современные возможности изучения биопленок микроорганизмов различными видами микроскопии.

О.С. Кузнецов, А.В. Казанцев, П.С. Ерохин, Д.В. Уткин, Н.А. Осина,

С.П. Заднова, Г.А. Ерошенко 53

Страницы истории. Юбилейные и знаменательные даты 2019 года 59

Правила для авторов 62

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Modern methodological techniques for the purification of cholera toxin.

L.P. Alekseeva, O.A. Yakusheva, V.P. Zyuzina, O.V. Duvanova, E.S. Shipko, R.V. Pisanov 5

Determining the optimal environment and conditions of submerged cultivation of a producer bacteriostatic metabolites of *Trichoderma atrobrunneum* RNCIM F-1434.

I.A. Gneusheva, N.E. Pavlovskaya, A.V. Lushnikov, O.A. Markina 10

Research of the interaction of aluminum with *Callitriche palustris* in the conditions of freshwater experimental systems.

V.A. Poklonov 17

Development of the method of introduction to cells culture and plant regeneration of decorative flax (*Linum grandiflorum*, *Linum perenne*).

I.I. Tashlieva, E.A. Gladkov 22

Biosafety of urban soil. Prospects of perfection of diagnostics and prevention of toxocarriasis.

O.B. Zhdanova, S.P. Ashihmin, L.A. Napisanova, E.S. Kliukina, A.G. Meshandin, V.S. Boldyrev, S.Yu. Bogoslovskii 25

Effect of probiotic preparation based on *Bacillus subtilis* on the rats intestinal microbial community.

E.V. Skvortsov, Rish. S. Muhammadiev, Rin. S. Muhammadiev, L.R. Valiullin 30

Products of enzymatic hydrolysis of glucan and chitin chains of chitin-glucan copolymers from micromycetes biomass.

N.Yu. Sharova, B.S. Manzhieva 36

Reviews

Tularemia bacteriophages and prospects for their use.

A.O. Kochetkova, N.E. Gaevskaya, N.V. Pavlovich, M.P. Pogozhova 42

The use of atomic force microscopy in studying the eukaryotic cell ultrastructure.

P.S. Erokhin, S.V. Generalov, D.V. Utkin, O.S. Kuznetsov, E.G. Abramova, N.A. Osina 47

Modern possibilities of studying microbial biofilms by various types of microscopy.

O.S. Kuznetsov, A.V. Kazantsev, P.S. Erokhin, D.V. Utkin, N.A. Osina, S.P. Zadnova, G.A. Eroshenko 53

Pages of history. Anniversary and significant dates 2019 59

Rules for authors 62

К читателям

В первом номере за 2019 год представлены оригинальные статьи и работы обзорного характера. Тематика выдержана в различных аспектах, отражающих традиционные подходы журнала. При этом отмечается некоторое преобладание работ по фундаментальным и прикладным основам инфекционной патологии.

Так, в исследовании «Современные методические приемы очистки холерного токсина», выполненном Алексеевой Л.П. с коллегами из Ростовского-на-Дону государственного научно-исследовательского противочумного института, на модели культуры клеток СНО-К1 продемонстрирована достаточно высокая биологическая активность очищенного токсина.

Группа авторов из Орловского государственного аграрного университета им. Н.В. Парахина (Гнеушева И.А. и др.) определила оптимальную среду и условия глубинного культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *Trichoderma atrobrunneum*.

Поклонов В.А. (Московский государственный областной университет) изучил изменения концентрации алюминия в воде экспериментальных экосистем (микроекосмов), чтобы определить токсичность и динамику концентрации ионов алюминия в водной среде этих микроекосмов, содержащих водное растение болотник (*Callitriche palustris*), имея в виду перспективность использования данного растения в целях фиторемедиации.

Ташлиева И.И., Гладков Е.А. (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН) описали разработанный ими метод введения в культуру клеток и регенерации растений декоративных видов льна.

Коллективом исследователей (Жданова О.Б. и др. из нескольких московских учреждений) с участием иностранных специалистов из Италии выполнена квалифицированная многоплановая работа по проблеме обеспечения биобезопасности урбаноземов, для того чтобы совершенствовать диагностику и профилактику токсокароза.

Сотрудниками Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности — Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (Казань) Скворцовым Е.В. с коллегами исследовано влияние пробиотического препарата на основе *Bacillus subtilis* на микробное сообщество кишечника крыс.

Шарова Н.Ю., Манжиева Б.С. из Всероссийского НИИ пищевых добавок (Санкт-Петербург) изучили состав продуктов ферментативного гидролиза глюкановых и хитиновых цепей хитин-глюкановых сополимеров из биомассы микромицетов, исходя из значимости последних как потенциальных продуцентов пищевых кислот и ферментов.

В разделе обзоров две статьи больших коллективов сотрудников Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (Саратов) посвящены главным образом вопросу об использовании атомно-силовой микроскопии применительно к микробиологическим задачам, а один обзор затрагивает крайне актуальную тему поиска перспективных туляремийных бактериофагов, которая всесторонне раскрыта группой сотрудников Ростовского-на-Дону противочумного института — Кочеткова А.О., Гаевская Н.Е., Павлович Н.В., Погожова М.П.

В исторической рубрике приведены юбилейные и знаменательные даты в области биотехнологии и физико-химической биологии с пятилетним пошаговым циклом.

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

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ОЧИСТКИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

Л.П. АЛЕКСЕЕВА*, О.А. ЯКУШЕВА, В.П. ЗЮЗИНА,
О.В. ДУВАНОВА, Е.С. ШИПКО, Р.В. ПИСАНОВ

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону государственный научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора*

С помощью различных методов, в том числе определенных условий культивирования штамма-продуцента, ультрафильтрации, ионообменной хроматографии, получен очищенный препарат холерного токсина. При контроле его чистоты в ПААГ показано, что он лишен белков-контаминантов и ЛПС. На модели культуры клеток СНО-К1 продемонстрирована достаточно высокая биологическая активность очищенного токсина.

Ключевые слова: холерный токсин, очистка, биологическая активность.

Введение

Для оценки токсигенности холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и эпидемической значимости выделенных штаммов в лабораторной практике используют молекулярно-генетические и иммунологические методы, поскольку применение генно-диагностических методов, несмотря на их высокую чувствительность и специфичность, имеет ряд ограничений. С одной стороны, необходимо иметь дорогостоящее оборудование, реактивы и особую организацию помещений, с другой, в пробах, клинических и из объектов окружающей среды (ООС), иногда содержатся примеси, ингибирующие ПЦР. Кроме того, наличие генов, детерминирующих синтез энтеротоксина, не всегда является показателем экспрессии самого токсина. Продукцию холерного токсина (ХТ) даже в небольших количествах определяют с помощью высокочувствительных иммунохимических методов, в частности ИФА. Лабораторией ВОЗ предложена методика проведения анализа с использованием GM1-ганглиозидов [4].

На основе моноклональных антител к В-субъединице ХТ Михеева и соавт. (2017) [2] разработали сэндвич-вариант дот-иммуноанализа (ДИА) и показали его высокую диагностическую значимость.

Современными перспективными методами анализа токсинсодержащих препаратов являются иммунохроматографические тест-полоски [7, 10, 11]. Проблема конструирования новых высокочувствительных и специфичных тест-систем, в наибольшей степени отвечающих требованиям экспрессности, простых в постановке, с визуальным учетом результатов, сохраняет актуальность, несмотря на наличие включенных в систему лабораторной диагностики холеры отечественных иммунодиагностикомов для выявления ХТ. Очевидно, что эффективность тест-систем для детекции ХТ зависит от качества используемых специфических иммунореагентов. За последнее десятилетие методы выделения ХТ постоянно совершенствуются, и применение находят те из них, которые позволяют максимально сохранять иммунореактивность специфических эпитопов.

Цель работы — выделение и очистка препарата холерного токсина для использования в диагностике холеры.

Материалы и методы

В работе был использован штамм *Vibrio cholerae classical 569B*, серовара Инаба. Исходным материалом для выделения ХТ служил обеззараженный мертиолятом (1:10000) центрифугат бульонной культуры. Для оптимального выхода ХТ использовали жидкую питательную среду по прописи Jang H. et al. [6], включающую в себя (на 1 л): 10 г дрожжевого экстракта; 30 г казामीновых кислот; 50 мг триптофана; 20 мг сульфата магния; 1,31 г двузамещенного фосфорнокислого натрия; 130 мг однозамещенного фосфорнокислого калия, рН 7,8, в которой

© 2019 г. Алексеева Л.П., Якушева О.А., Зюзина В.П., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В.

* **Автор для переписки:**

Алексеева Людмила Павловна

доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией гибридом

E-mail: lpalekseeva@yandex.ru

выращивали клетки *V. cholerae classical 569B* при 32 °С в течение 18 часов с дополнительной аэрацией.

На начальном этапе концентрирование и очистку проводили с использованием ультрафильтрационной установки Amicon с мембранами PM-10-30. Дальнейшую очистку осуществляли методом ионообменной хроматографии на FPLC Pathfinder Duoflow (Bio-Rad). Для этого препарат наносили на катионообменную колонку monoS (Pharmacia).

Количество ХТ и иммунохимическую активность определяли иммуноферментным методом с моносиалганглиозидами в реакции GM1-ИФА [3].

По ходу очистки ХТ наличие О-антигена ЛПС в его составе регистрировали методом дот-ИФА с помощью реагентов «Имуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена» [1].

Электрофорез очищенного энтеротоксина проводили по U.K. Laemmli [8] в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в системе Bio-Rad (США). Использовали маркеры молекулярной массы фирмы Bio-Rad. Для обнаружения белков использовали окрашивание Кумасси синим R-250. Концентрацию белка определяли по Лоури или спектрофотометрически [9]. Биологическую активность ХТ оценивали на перевиваемой клеточной линии СНО-К1 (овариальные клетки китайского хомячка) [5]. Нейтрализацию действия ХТ осуществляли с помощью антитоксической сыворотки.

Результаты и обсуждение

Известно, что токсигенные холерные вибрионы O1, O139 серогруппы отличаются низким уровнем токсинообразования; исключение составляют отдельные штаммы. Для повышения выхода токсина мы использовали штамм-продуцент *V. cholerae classical 569B*, питательную среду по прописи Jang H. et al. [6]. В имеющейся зарубежной и отечественной литературе описано немало методических приемов, конечной целью которых является получение очищенного ХТ, обладающего высокой иммунохимической и биологической активностью. Однако некоторые из них отличаются большой продолжительностью технологического процесса, наличием множества стадий. Разработка эффективной технологии получения В-субъединицы холерогена в чистом виде продолжает оставаться актуальной задачей, так как такой препарат необходим для создания и совершенствования профилактических и диагностических препаратов.

На сегодняшний день концентрирование и частичную очистку холерогена от белков-контаминантов и дру-

гих примесей первоначально проводят с помощью новых фильтрационных технологий. В наших опытах выделение токсина из обеззараженного супернатанта на первых этапах осуществляли путем мембранной ультрафильтрации на установке Amicon с удалением белков молекулярной массой свыше 30 кДа и одновременным концентрированием в 4 раза. В полученном концентрате определяли содержание ХТ и О-антигена, количество последнего в исходном препарате может быть значительным (рис. 1), так как в процессе культивирования штамма-продуцента *V. cholerae classical O1 569B* в жидкую среду одновременно с холерным токсином выделяется и растворимый О-антиген. При этом комплекс белки-ЛПС, включая и токсин, является сильным иммуногеном, способным индуцировать образование антител к ЛПС в достаточно высоком титре. В нашем распоряжении имелся Набор реагентов «Имуноглобулины диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae O1* и *O139* (in vitro) методом ИФА, дот-ИФА». Моноспецифические иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой, направлены к эпитопам О-антигена, ЛПС *V. cholerae O1*, и поэтому его можно выявлять с помощью вышеупомянутой тест-системы. Используя этот набор, мы контролировали наличие O1-антигена в исследуемых образцах на всех этапах очистки ХТ. На рисунке 1 представлены различные по степени очистки токсинсодержащие образцы, в которых определяли наличие O1-антигена ЛПС в дот-ИФА с помощью моноклональных пероксидазных конъюгатов. Как видно на рисунке 1, в исходном супернатанте штамма-продуцента О-антиген выявляется до разведения 1:8, в концентрате после ультрафильтрации на установке Amicon этот показатель равняется 1:32.

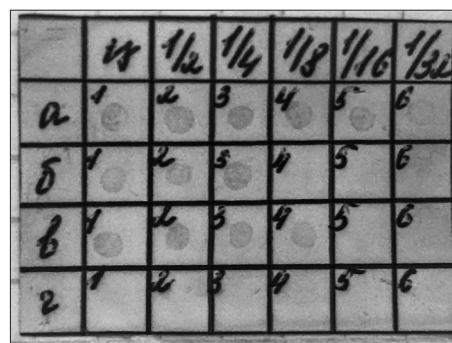


Рис. 1. Определение O1-антигена ЛПС в токсинсодержащих препаратах. а — клетки *V. cholerae classical, 569B*; б — исходный супернатант *V. cholerae classical 569B*; в — концентрат ХТ; г — токсинсодержащий образец: разведения исследуемых препаратов ц (цельный), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32

Дальнейшую очистку проводили методом ионообменной хроматографии на приборе FPLC PathfinderDuoflow (Bio-Rad). Концентрат холерного токсина наносили на топо S колонку, наполненную катионообменной смолой, и промывали 10 мМ фосфат-

ным буфером для удаления несорбированных белков. Токсин элюировали линейным градиентом NaCl (KCl) от 0 до 0,5 М, в 10 мМ фосфатном буфере, рН 7,0. В результате получали фракции, в которых определяли наличие ХТ с помощью GM1-ИФА (рис. 2).

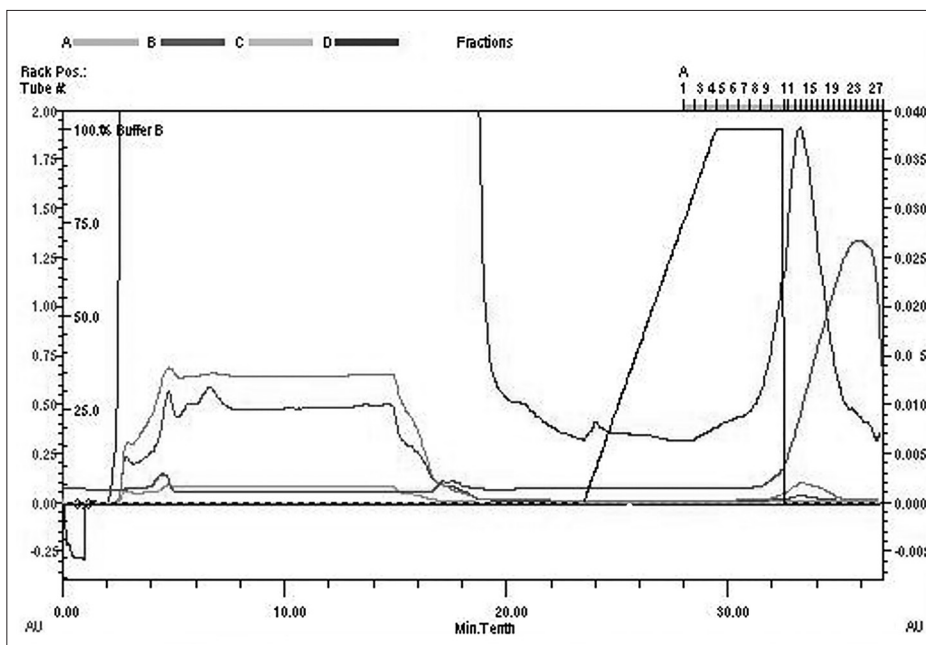


Рис. 2. Профиль элюции токсинсодержащего образца из штамма *V. cholerae classical* O1 569В на колонке топо S. Пик 1 – «проскок» – белковые молекулы, не связавшиеся с носителем. Пик 2 – сиреневый пик D – очищенный препарат холерного токсина

На рисунке 2 пик 1 представлял собой белковые молекулы, не связавшиеся с носителем («проскок»). Холерный токсин содержался во 2 пике и элюировался после увеличения молярности NaCl до 0,25–0,3 М, что подтверждено положительной реакцией с антитоксической сывороткой в реакции GM1- ИФА. Фракции второго пика, содержащие ХТ, объединяли и анализировали в 12%-ном SDS-ПААГ с маркерами молекулярных масс. Данный метод позволяет оценить качество хроматографической очистки холерного токсина и наглядно продемонстрировать, содержит ли он в своем составе белки-контаминанты. Как видно на рисунке 3, очищенный препарат имеет одну белковую полосу на уровне маркеров молекулярных масс примерно 24–26 кДа, что соответствует субъединице А – ХТ. Субъединица В – ХТ представляет собой белок молекулярной массой 58 кДа с мономерами 11–12 кДа. Образец ХТ после очистки с помощью ионообменной хроматографии исследовали на наличие O-антигена ЛПС. На рисунке 3, отражающем результаты анализа различных по степени чистоты образцов ХТ, видно, что в составе очищенного препарата отсутствует вышеупомянутый антиген. Очевидно, что совокупность

различных методических приемов позволила получить препарат ХТ без примесей белков и ЛПС.

Препарат очищенного ХТ планируется использовать для получения антитоксической сыворотки и МКА, поэтому важно определение его биологической активности.

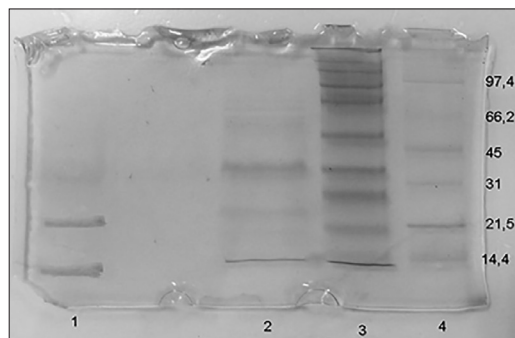


Рис. 3. Электрофореграмма очищенного препарата холерного токсина из штамма *V. cholerae classical* O1 569В. 1 – очищенный препарат ХТ. 2 – культуральная жидкость, сконцентрированная на приборе Amicon (мембрана Р-10). 3 – исходная токсинсодержащая бесклеточная культуральная жидкость. 4 – маркеры мол. масс

Для оценки эпидемической значимости токсигенных холерных вибрионов используются не только лабораторные животные, но и культура клеток. Альтернативной моделью являются клетки СНО-К1, которые позволяют дать количественную и качественную оценку токсинопродуцирующей способности холерных вибрионов. Клетки-мишени СНО-К1 реагируют на действие холерного токсина удлинением. Однако обнаружение ХТ в препаратах различной степени очистки может быть затруднено, если они наряду с холерным токсином содержат различные биологически активные соединения, и в результате могут регистрироваться морфологические изменения, не свойственные ХТ, в виде округления или деструкции клеток.

В связи с этим надо располагать препаратом очищенного ХТ и, в первую очередь, определять его чувствительность в отношении клеток СНО-К1.

В наших опытах он вызывал удлинение клеток в разведении 1:100000 (10 нг/мл), то есть до этой дозы регистрируются морфологические изменения СНО-К1 (рис. 4).

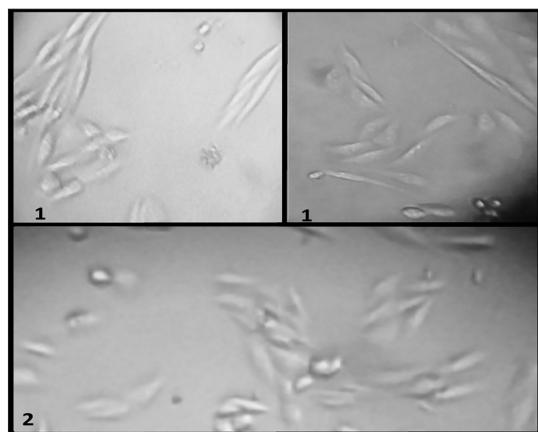


Рис. 4. Цитотоксическое действие холерного токсина на культуру клеток СНО-К1. 1 — опытный образец с холерным токсином — удлинение клеток СНО-К1. 2 — контрольный образец без холерного токсина — отсутствие удлинения

Для доказательства, что эффект удлинения обусловлен ХТ, необходима нейтрализация реакции специфической антитоксической сывороткой. С целью нейтрализации цитотоксического действия использовали полученную нами кроличью антитоксическую сыворотку.

Препарат чистого ХТ в различных разведениях, начиная с 1:100 и до 1:100000, инкубировали с сывороткой в разведении 1:1000 в течение 30 минут, а затем внесли в культуру клеток. Обработка токсинсодержащих образцов антитоксической сывороткой сопровождалась

полной нейтрализацией цитотоксического действия ХТ. В то же время у клеток СНО-К1, подвергнутых действию только токсина, регистрировали их четко выраженное удлинение. Применение клеточных линий выгодно экономически, так как исключает содержание лабораторных животных и отвечает международным требованиям «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Заключение

Таким образом, в результате применения различных методических приемов, включающих в себя определенные условия культивирования штамма-продуцента, ультрафильтрацию, ионообменную хроматографию, получен очищенный препарат ХТ. Контроль его чистоты в ПААГ свидетельствует, что он лишен белков-контаминантов и ЛПС.

На модели культуры клеток СНО-К1 показана достаточно высокая биологическая активность очищенного ХТ, который на следующем этапе исследований будет использован для получения антитоксической сыворотки и характеристики МКА.

Литература

1. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Буриша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры // Клиническая лабораторная диагностика. — 2016. — № 5. — С. 303–307.
2. Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Терешкина Н.Е. и др. Получение и применение моноклональных антител для обнаружения холерного токсина / Современ. технологии в совершенств. мер предупр. и отв. действий на ЧС в области обществ. здравоохран. сан.-эпид. характера: Матер. XI Межгос. науч.-практ. конф. — Саратов, 2012. — С. 162–164.
3. Сальникова О.И., Алексеева Л.П., Подосинникова Л.С., Лобанов В.В. и др. Чувствительность культуры клеток СНО-К1 и ТИФА при тестировании холерного токсина in vitro // Пробл. комиссия «Холера и патоген. для человека вибрионы». — Ростов-на-Дону, 1999. — Вып. 12. — С. 83–84.
4. Detection of Cholera Toxin. Chapter 7 / In: Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae* Centers for Disease Control and Prevention. — Atlanta, GA, 1994. — P. 62–88.
5. Guerrant R.L., Brunton L.L., Schnaitman T.C., Rebhun L.I., and Gilman A.G. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxin of *Vibrio cholerae*

- and *Escherichia coli* // *Infect. Immun.* – 1974. – Vol. 10. – No. 2. – P. 320–327.
6. Jang H., Kim H.S., Kim J.A., Seo J.H., Carbis R. Improved purification process for cholera toxin and its application to the quantification of residual toxin in cholera vaccines // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 19. – No. 1. – P. 108–112.
7. Kallury P., Naheed A., Rahman S., Ansaruzzaman M., Faruque A.S., Bird M. et al. Evaluation in there rapid diagnostic test for cholera: does the skill level of the technician matter? // *Trop. Med. Int. Health.* – 2006. – Vol. 11(1). – P. 49–55.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227(5259). – P. 680–685.
9. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., R.J. Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – No. 1. – P. 265–275.
10. Nato F., Boutonnier A., Rajerison M., Grosjean P., Dartevelle S., Guenole A. et al. One-step immunochromatographic dipstick test for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2003. – Vol. 10(3). – P. 476–478.
11. Wang X.Y., Ansaruzzaman M., Vaz R., Mondlane C., Lucas M.E., von Seidlein L. et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test the diagnosis of cholerae in a high-risk population // *BMC Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 6. – P. 17. doi:10.1186/1471-2334-6-17.

MODERN METHODOLOGICAL TECHNIQUES FOR THE PURIFICATION OF *CHOLERA TOXIN*

L.P. ALEKSEEVA, O.A. YAKUSHEVA, V.P. ZYUZINA,
O.V. DUVANOVA, E.S. SHIPKO, R.V. PISANOV

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

Using various methods, including certain conditions of cultivation of the producer strain, ultrafiltration, and ion-exchange chromatography, a purified preparation of cholera toxin was obtained. When controlling its purity in PAGE, it was shown that it lacks protein contaminants and LPS. The model of cell culture CHO-K1 demonstrated a sufficiently high biological activity of purified toxin.

Keywords: cholera toxin, purification, biological activity.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ *TRICHODERMA ATROBRUNNEUM* ВКПМ F-1434

И.А. ГНЕУШЕВА*, Н.Е. ПАВЛОВСКАЯ, А.В. ЛУШНИКОВ, О.А. МАРКИНА

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

Определена физиологическая зависимость диаметра колонии *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от величины рН питательной среды и источника углевода. Наиболее обильный, быстрый рост определялся при культивировании на средах с высоким рН ($r=+0,95$). Избыток углерода стимулирует накопление биомассы продуцента ($r=+0,95$), что снижает синтез бактериостатических метаболитов, ($r=-0,98$). Экстракт культуральной жидкости хорошо растворим в этилацетате, ацетоне, ацетонитриле, в этаноле представляет собой маслянистую жидкость от желтого до коричневого цвета, при взбалтывании переходит в эмульсию, при экстракции бутанолом-1 частично теряет бактериостатическую активность. Максимум поглощения этилацетатного экстракта отмечен на длине волны 275 нм, R_f активной фракции метаболитов 0,44. Определен оптимальный режим культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434: сахароза – 15 г/л, NaNO_3 – 2 г/л, K_2HPO_4 – 1 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г/л, KCl – 0,5 г/л, FeSO_4 – 0,1 г/л, температура – 28 °С, перемешивание – 120 мин⁻¹, посевная доза – 0,5% (v/v), время инкубации – 5 суток.

Ключевые слова: *Trichoderma atrobrunneum*, бактериостатическая активность, вторичные метаболиты, оптимизация, культивирование, сахароза.

Введение

В последние годы одним из важнейших направлений биотехнологии является поиск, изучение и разработка способов получения биологически активных соединений различного происхождения (микроорганизмы, животные, растения и т.д.), обладающих антимикробной активностью [6, 8, 11, 14].

Вторичным метаболитам с высокой бактерицидной и/или бактериостатической активностью уделено особое внимание биотехнологов мира. К данной категории соединений относятся продукты жизнедеятельности сапротрофных грибов рода *Trichoderma* – одного из наиболее актуальных продуцентов в современных условиях [12, 17, 18]. Их представители способны синтезировать и выделять большое количество веществ, включая экстрацеллюлярные полипептиды [19], находящие применение в различных областях медицины и сельского хозяйства

[5, 7, 13]. В последнее время в связи с перспективами использования их для разработки лекарственных препаратов нового поколения интерес к ним резко возрос [15, 16, 20].

Говоря о биотехнологическом производстве, следует заметить, что микробные культуры высокочувствительны к условиям ферментации. Так, например, процесс культивирования включает в себя выбор источников питания, подбор количества посевного материала, подбор оптимальных условий роста (значение температуры, рН среды, аэрация и т.д.). Немаловажным аспектом в решении такого рода задач является нахождение оптимальной питательной среды и определение степени влияния ее компонентов на параметры роста микроорганизмов. Только при удачном подборе всех факторов обеспечивается достаточно быстрый рост и развитие популяции микроорганизмов и считается сбалансированным [9, 10].

Оптимизация питательной среды представляется эффективным методом повышения биосинтетической активности продуцентов биологически активных веществ [2]. Методы математического планирования эксперимента позволяют одновременно изучить действие нескольких факторов на интересующий процесс, но и качественно/количественно оценить степень их влияния [3].

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования было поставлено увеличение синтетической

© 2019 г. Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Лушников А.В., Маркина О.А.

* Автор для переписки:

Гнеушева Ирина Алексеевна

кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»

E-mail: obc1-2010@mail.ru

активности *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в лабораторных условиях путем оптимизации параметров глубинного культивирования.

Материалы и методы

С целью подбора наиболее подходящей питательной среды для глубинного культивирования изучали культуральные свойства *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 (диаметр колонии, скорость радиального роста, споруляцию) на средах для культивирования поверхностным способом [1]. Пятисуточный неспорулирующий мицелий засеивали петлей в центр среды, инкубировали при температуре 28 °С. В качестве контроля использовали среду Сабуро.

Компоненты питательных сред отбирали согласно инструкциям для приготовления:

Компоненты	Чапека	NSA ¹	сусло	PDA ²	Сабуро
pH	7,3±0,2	7,3±0,2	4,8±0,2	5,6±0,2	6,0±0,3
FeSO ₄	0,01	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	1	1	1	-	-
KCl	0,5	0,5	-	-	-
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,5	0,5	-	-	-
NaNO ₃	2	2	-	-	-
NH ₄ Cl	-	-	1	-	-
Глюкоза	-	0,2	-	-	40
Декстроза	-	-	-	20	-
Мальтоза	-	-	12,75	-	-
Сахароза	30	0,2	-	-	-
Декстрин	-	-	2,75	-	-
Картофельный экстракт	-	-	-	4	-
Солодовый экстракт	-	-	15	-	-
Пептон	-	-	0,78	-	10
Агар	15	15	15	20	15

Примечание: 1 – синтетический обедненный агар; 2 – картофельно-декстрозный агар

Кинетику роста продуцента определяли в процессе глубинного гетерофазного культивирования в биореакторе Minifors (Infors, Германия) на 5 л номинального объема. Оптическую плотность культуральной жидкости измеряли на спектрофотометре СФ-52 (ЛОМО, Россия) при длине волны 620 нм в кювете с величиной оптического пути 1 см, полученное значение пересчитывали в КОЕ/мл.

Глубинное культивирование. Пятисуточный неспорулирующий мицелий агаровой культуры *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 стандартизировали до 1,5 по McFarland и засеивали на 100 мл питательного бульона в соотношении 1:10 в колбах Эрленмейера на 250 мл, инкубировали 5 суток при температуре 28 °С, с орби-

тальным перемешиванием 600 мин⁻¹. Реактор готовили к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации; загружали солевую основу питательной среды, стерилизовали 10-минутным автоклавированием при давлении 1 атм. в сборке с системой рН-стабилизации, охлаждали до 28 °С. В условиях стерильного бокса БАВп-0,1 – «Ламинар-С.» 1,2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия) асептически вносили стерильный концентрат углевода, устанавливали рН, засеивали подготовленным инокулятом продуцента. Ферментацию осуществляли при температуре 28,0±0,5 °С, с числом оборотов 120 мин⁻¹; с контролем и коррекцией рН, температуры и перемешивания.

Экстракция. Полученную культуральную жидкость очищали от грибных тел последовательной фильтрацией через марлю (ГОСТ 9412-93) и бумажный фильтр (ГОСТ 12026-76), центрифугировали 10 минут с ускорением 10000 g, осадок отделяли через мембраны «Владипор» типа МФА-МА (ТУ 6-05-1903-87) под вакуумом. Фильтрат культуральной жидкости соединяли с равным объемом этилового эфира уксусной кислоты ЧДА и перемешивали 180 минут на магнитной мешалке при комнатной температуре, в темноте. Отстаивали до разделения слоев и отбирали неполярную фракцию. Упаривали на ротационном испарителе RE-52AA до полного удаления растворителя при t=40±0,1 °С, p=-1±0,5 атм., восстанавливали в 5 мл 60% раствора этилового спирта (ГОСТ 5962-2013).

Оценку антибактериальной активности экстракта культуральной жидкости *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 проводили диско-диффузионным методом по МУК 4.2.1890-04. В качестве модельного объекта использовали клинический штамм *E. coli* с %_{id} = 90,31; T_{in} = 0,53 по «ЭНТЕРОтест 24» (АО «Эрба Рус», г. Москва), чувствительный к ампициллину. Контролем служили диски с ципрофлоксацином 5 мкг/диск («ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», г. Санкт-Петербург) и стандартные культуры *E. coli* ATCC 25922, *B. coagulans* ATCC 31284, *B. subtilis* ATCC 6633. Чувствительность: ≤6 мм – отсутствует; 6,1–12,0 мм – слабая; 12,1–18,0 мм – средняя; 18,1≤ мм – высокая.

Оптимизация процесса культивирования методом планирования эксперимента. Для достижения максимально возможной синтетической активности продуцента (в рамках эксперимента) был реализован полный факторный эксперимент по оптимизации процесса культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Количество необходимых опытов рассчитывали по

формуле $N=2^n$, где n – число факторов. Параметром оптимизации Y был выбран диаметр зоны подавления роста тест-культуры *E. coli*. Факторами варьирования

были выбраны: X_1 – посевная доза продуцента, % v/v; X_2 – время инкубации, сутки; X_3 – концентрация сахарозы, г/л (табл. 1).

Таблица 1

Факторы варьирования при проведении полного факторного эксперимента по оптимизации процесса культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Вариант	Факторы варьирования			Единица варьирования (λ)
	X_1	X_2	X_3	
1	+	+	+	
2	-	+	+	
3	+	-	+	
4	-	-	+	
5	+	+	-	
6	-	+	-	
7	+	-	-	
8	-	-	-	
Фактор	Уровень			Единица варьирования (λ)
	нижний (-)	средний (0)	верхний (+)	
X_1	0,5	0,75	1,0	0,25
X_2	5	7,5	10	2,5
X_3	15	22,5	30	7,5

Результаты и обсуждение

Подбор питательной среды для глубинного культивирования. В эксперименте со средой Чапека отмечался очень быстрый рост – 70 ± 5 мм на 5-е сутки инкубирования. К 7 суткам мицелий белого цвета, высотой до 2 мм покрывал всю плоскость агар в чашке Петри (\varnothing 90 мм), спороношение обильное, концентрическими зонами. На среде NSA микромицет

вырастал до 90 мм за 7 суток, спороношение среднее. На сусло-агаре диаметр колонии составил 50 ± 5 мм на 7-е сутки культивирования. К 10 суткам зарастала вся чашка Петри, мицелий средний, спороношение среднее. На среде PDA микроорганизм вырастал до 60 мм за 7 суток. Мицелий до 1 мм в высоту, спороношение обильное. На среде Сабуро отмечался быстрый, обильный рост – 80 мм на 7-е сутки, мицелий до 2 мм в высоту, спороношение среднее (рис. 1).

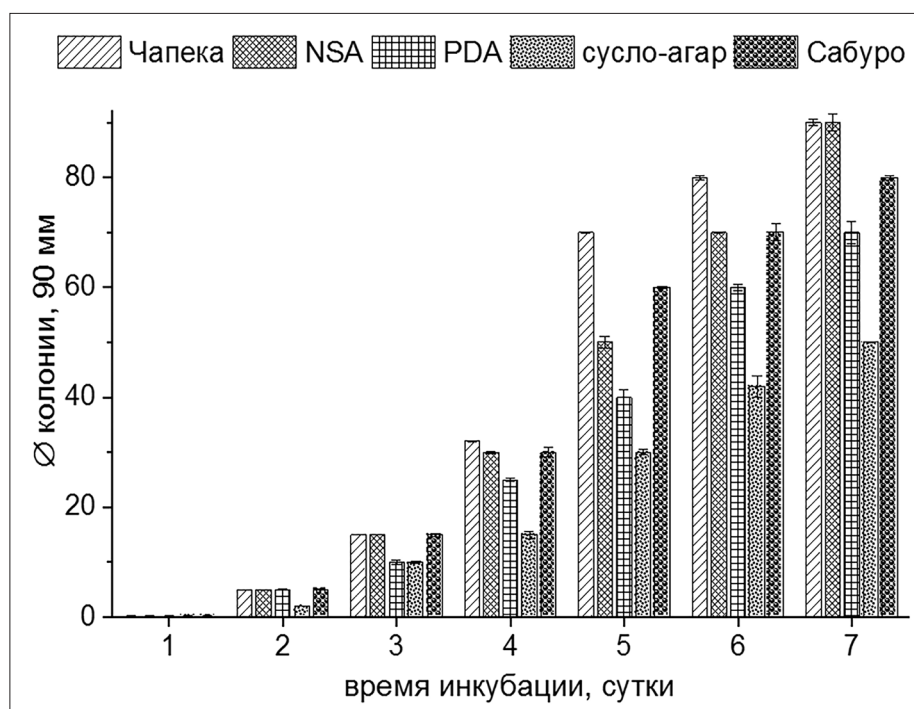


Рис. 1. Рост *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 на различных питательных средах

По результатам опытов определена физиологическая зависимость диаметра колонии *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от величины рН питательной среды ($r=+0,95$) и источника углерода. Наиболее обильный, быстрый рост определялся при культивировании на средах с высоким рН (из представленного набора сред) и уменьшался пропорционально снижению показателя, оптимальное значение рН составило 7,0–7,5. Сахароза установлена как наиболее подходящий источник углерода $K_s=0,202$ г/л $\mu_m=0,089$ ч⁻¹ [4]. Таким образом, оптимальной для глубинного культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 определена среда Чапека.

В результате экстракции этилацетатом из культуральной жидкости от культивирования продуцента получали препарат, который в спиртовом растворе представлял собой маслянистую, слегка опалесцирующую жидкость оранжевого цвета. При стоянии в холоде оседал в виде капель, при взбалтывании переходил в эмульсию, хорошо растворялся в этилацетате, ацетоне, ацетонитриле. В аналогичной схеме выделения метаболитов бутанолом-1 наблюдалось выраженное снижение бактериостатической активности (табл. 2).

Таблица 2

Бактериостатическая активность метаболитов продуцента, выделенных различными экстрагентами

Тест-штаммы	Ø зона подавления роста $X_{cp} \pm \sigma$, мм		
	экстрагент		ципрофлоксацин
	этилацетат	бутанол-1	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	22,0±0,32	10,1±0,05	25,2±0,05
<i>B. coagulans</i> ATCC 31284	25,4±0,23	12,0±0,21	33,0±0,25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	22,5±0,18	18,0±0,32	23,2±0,32

Для определения УФ-спектра препарат разводили в 100 раз этилацетатом и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-52 (ЛОМО, Россия) в кювете с величиной оптического пути 1 см. Рабочий раствор имел желтый оттенок, прозрачен, максимум поглощения отмечен на длине волны 275 нм. После ТСХ в системе хлороформ:метанол (3:1) и биоавтографии на тест-микроорганизме *E. coli* установлено значение R_f активной фракции метаболитов, численно равное 0,44.

Полный факторный эксперимент (ПФЭ 2³) по оптимизации условий культивирования продуцента.

Соответствуя сгенерированной матрице планирования, реализовали 8 опытов культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Корреляционный анализ показал, что в предлагаемой модели наибольшее влияние на синтетическую активность оказывал фактор X_3 (концентрация сахарозы), $r=-0,944$.

С помощью тестов Дарвина – Уотсона ($DW=0,94$; $d_L=0,368$; $d_U=2,287$) и Бреуша – Годфри ($T=1,16$; $t_{кр}=2,3646$) установили отсутствие автокорреляции между объясняемыми переменными, тестом Уайта исключили гетероскедастичность. В результате обработки данных получили значения коэффициентов уравнения регрессии: $b_0=32,425 \pm 2,2$ ($p=0,0001$), $b_1=-2,05 \pm 1,67$ ($p=0,2856$), $b_2=-0,445 \pm 0,17$ ($p=0,0556$), $b_3=-0,565 \pm 0,055$ ($p=0,0005$), среди которых значимыми признаны b_0 и b_3 ($p<0,05$), при которых модель адекватна исходным данным. Таким образом, уравнение регрессии получило вид:

$$Y = 32,425 - 0,565X_3; R^2 = 0,965.$$

На основании вышеизложенного установили, что оптимальная концентрация сахарозы равна 15 г/л и составляет 50% от навески стандартной рецептуры среды Чапека. В данном случае наблюдали максимальные значения диаметра зон подавления роста *E. coli*, что говорит о наибольшей синтетической активности *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434.

В процессе исследования определили зависимость прироста биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от концентрации сахарозы ($r=+0,95$). Рецептурная навеска углевода стимулировала накопление биомассы продуцента, которое, в свою очередь, приводило к уменьшению диаметра зон подавления роста *E. coli* ($r=-0,98$) (рис. 2).

Также стоит отметить, что при инокуляции высокой дозы культуры продуцента наблюдали быстрое истощение субстрата, сопровождаемое споруляцией на 3–4-е сутки культивирования. Отдельно касаясь эффекта споруляции, необходимо сказать, что данное явление наблюдалось и в оптимизированных условиях при культивировании свыше 5 суток, а также во всех вариантах эксперимента при воздействии естественного и/или искусственного освещения.

На рисунке 3 отображена динамика исследуемых параметров культивирования в оптимизированных условиях.

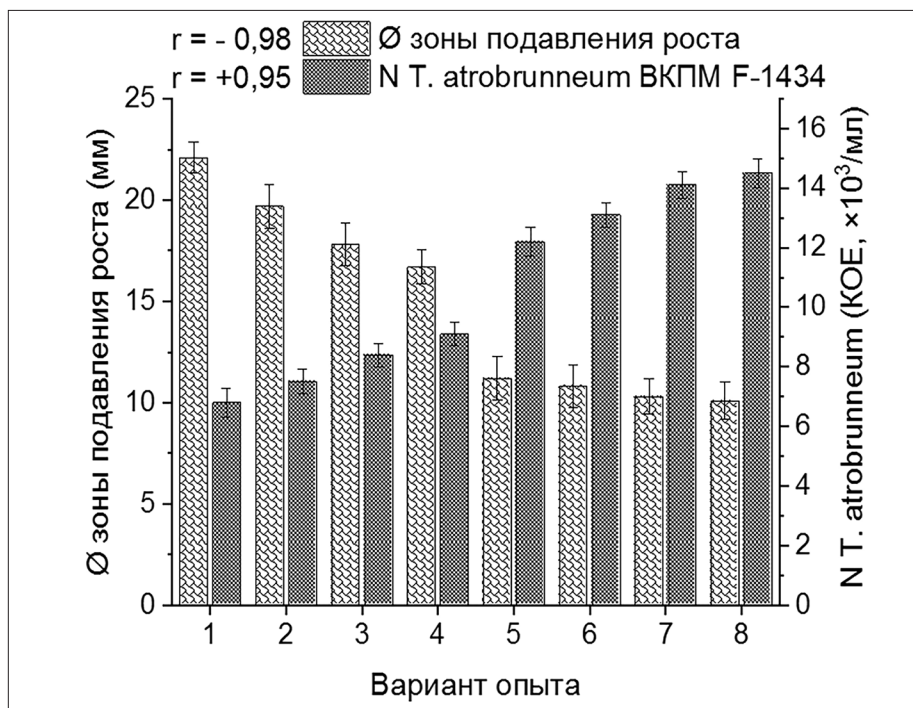


Рис. 2. Зависимость прироста биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от концентрации сахарозы ($r=+0,95$)

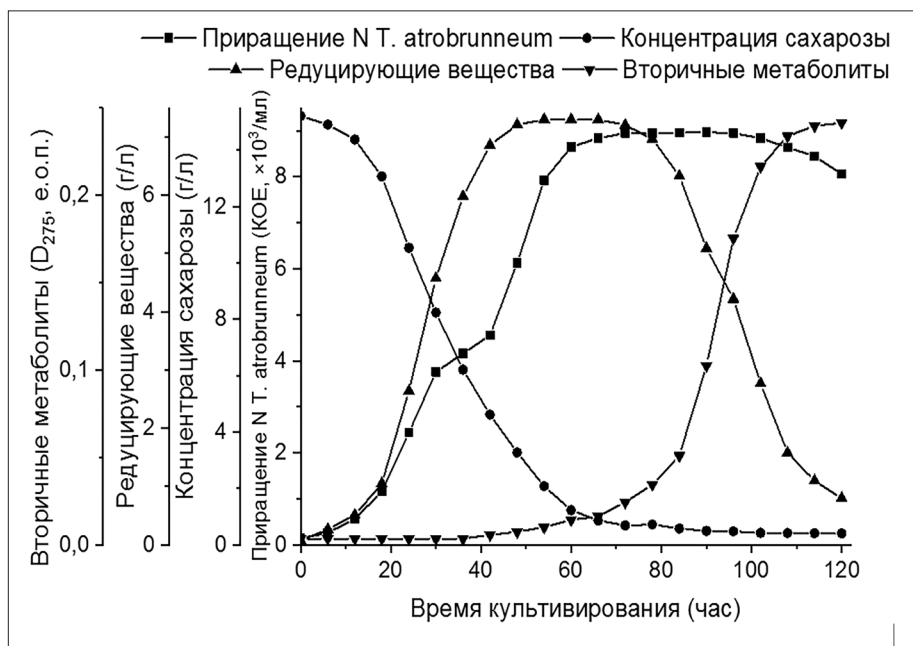


Рис. 3. Динамика исследуемых параметров культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в оптимизированных условиях

Заключение

На основании проведенного эксперимента можно сделать вывод, что наибольшая синтетическая активность *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 определяется при культивировании продуцента в течение 5 суток при температуре 28 °С, с использованием по-

севной дозы продуцента 0,5% v/v и лимитированием сахарозы до 50% навески стандартного состава среды Чапека.

В конце культивирования содержимое реактора требует очистки, включающей в себя несколько стадий фильтрации/центрифугирования (сепарирование) до получения беспоровой культуральной жидкости.

В спиртовом растворе препарат представляет собой маслянистую жидкость жёлтого < оранжевого < коричневого цвета, растворяется в этилацетате, ацетоне, ацетонитриле. Экстракт, полученный с помощью бутанола-1, обладает в 2,2–2,75 раз меньшей бактериостатической активностью.

Таким образом, по совокупности результатов исследований был установлен оптимальный режим культивирования *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 – продуцента бактериостатических метаболитов: сахароза – 15 г/л, NaNO₃ – 2 г/л, K₂HPO₄ – 1 г/л, MgSO₄×7H₂O – 0,5 г/л, KCl – 0,5 г/л, FeSO₄ – 0,1 г/л, температура – 28 °С, перемешивание – 120 мин⁻¹, посевная доза – 0,5% (v/v), время инкубации – 5 суток.

Литература

1. Александрова А.В. Грибы рода *Trichoderma* Pers: Fr. Таксономия, географическое распространение и экологические особенности: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М.: МГУ, 2002. – 46 с.
2. Арзамасцев А.А., Андреев А.А. Математические модели кинетики микробного синтеза: возможности использования и новые подходы к разработке // Вестн. Тамбов. ун-та. Серия: Естеств. и техн. науки. – 2000. – № 5(1). – С. 111–130.
3. Бочкарев В.В. Оптимизация технологических процессов органического синтеза: учебное пособие. – Томск: Издательство Томского политехнического университета. – 2010. – 185 с.
4. Гнеушева И.А., Лушников А.В., Павловская Н.Е. и др. Математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atrobrunneum* на питательной среде с различными углеводными компонентами // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2018. – Т. 14(3). – С. 13–18.
5. Куварина А.Е., Кураков А.В., Садыкова В.С. и др. Нерибосомальные пептиды грибов: биологическая активность и их перспективы в медицине // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – № 18(3). – С. 36–41.
6. Логинов О.Н., Четвериков С.П. Биосинтез низкомолекулярных метаболитов бактериями *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 51 // Биотехнология. – 2003. – № 5. – С. 22–25.
7. Павловская Н.Е., Гнеушева И.А., Маркина О.А. и др. Перспективы применения мицелиальных грибов *Trichoderma* spp. в зоотехнии и ветеринарной медицине // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2016. – № 12. – С. 87–91.
8. Петриченко В. М., Сухина Т.В., Одегова Т.Ф. и др. Антимикробная активность извлечений из трех видов *Euphrasia* L. // Растительные ресурсы. – 2002. – № 3(38). – С. 82–86.
9. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А. и др. Антимикробная активность веществ, продуцируемых штаммом *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228: оптимизация лабораторного культивирования и спектр действия индивидуальных пептаиолов // Антибиотики и химиотерапия. – 2015. – № 60(11). – С. 3–8.
10. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А. и др. Антисептическая активность штамма *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228 – продуцента пептаиолов в условиях жидкофазного и твердофазного культивирования // Успехи медицинской микологии. – 2016. – № 16. – С. 164–166.
11. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А. и др. Образование штаммом *Trichoderma citrinoviride* ТУVI 4/11 антибиотиков-пептаиолов // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – № 1. – С. 41–46.
12. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина Е.А. и др. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – № 51(3). – С. 1–9.
13. Садыкова В.С. Экология грибов рода *Trichoderma* бассейна реки Енисей, их биологические свойства и практическое использование: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М.: МГУ, 2012. – 46 с.
14. Сычева М.В., Галиуллина Л.Ф., Карташова О.Л. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на антибиотикочувствительность микроорганизмов // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2011. – № 1(2). – С. 41–44.
15. Abid A., Bacha N., Ahmad B., et al. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites // Asian Pac. J. Trop. Biomed. – 2014. – Vol. 4(11). – P. 859–870.
16. Brakhage A. Regulation of fungal secondary metabolism // Nature Rev. Microbiology. – 2012. – Vol. 6. – P. 1–12.
17. Druzhinina I., Herrera-Estrella A., Seidl-Seiboth V., et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success // Nature Reviews Microbiology. – 2011. – Vol. 9(10). – P. 43–56.
18. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts // Nature Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2. – P. 43–56.
19. Hermosa R., Cardoza R., Rubio M., et al. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma* / In: Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. – Elsevier, 2014. – P. 125–137.
20. Holt A., Killian J.A. Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models // Eur. Biophys. J. – 2010. – Vol. 39. – P. 609–621.

DETERMINING THE OPTIMAL ENVIRONMENT AND CONDITIONS OF SUBMERGED CULTIVATION OF A PRODUCER BACTERIOSTATIC METABOLITES OF *TRICHODERMA ATROBRUNNEUM* RNCIM F-1434

I.A. GNEUSHEVA, N.E. PAVLOVSKAYA, A.V. LUSHNIKOV, O.A. MARKINA

N.V. Parahin Orel State Agrarian University, Orel

The physiological dependence of the diameter of the colony of *T. atrobrunneum* RNCIMF-1434 on the pH value of the nutrient medium and the carbon source was determined. The most abundant, rapid growth was determined during cultivation on high pH media ($r=+0.95$). Excess carbohydrate stimulates the accumulation of producer biomass ($r=+0.95$), which reduces the synthesis of bacteriostatic metabolites ($r=-0.98$). The extract of the culture liquid is highly soluble in ethyl acetate, acetone, acetonitrile, in ethanol is an oily liquid from yellow to brown, when agitating goes into the emulsion, while extraction with butanol-1 partially loses its bacteriostatic activity. The maximum absorption of the ethyl acetate extract is noted at a wavelength of 275 nm, the Rf active fraction of metabolites is 0.44. The optimal cultivation mode of *T. atrobrunneum* F-1434 was determined: sucrose – 15 g/l, NaNO_3 – 2 g/l, K_2HPO_4 – 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5 g/l, KCl – 0.5 g/l, FeSO_4 – 0.1 g/l, temperature – 28 °C, stirring – 120 min⁻¹, sowing dose – 0.5% (v/v), incubation time – 5 days.

Keywords: *Trichoderma atrobrunneum*, bacteriostatic activity, secondary metabolites, optimization, cultivation, sucrose.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЮМИНИЯ С *CALLITRICHE PALUSTRIS* В УСЛОВИЯХ ПРЕСНОВОДНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СИСТЕМ

В.А. ПОКЛОНОВ*

Московский государственный областной университет, Мытищи, Московская обл.

Исследованы изменения концентрации солей алюминия (Al) в воде экспериментальных экосистем (микроекосмов). В микроекосмах инкубированы водные растения *Callitriche palustris* L. (Болотник болотный). Гидробионт *C. palustris* впервые используется в биотестировании. Цель данного исследования — изучить токсичность и динамику концентраций ионов алюминия в водной среде микроекосмов, содержащих высшее водное растение *C. palustris*. Концентрации алюминия в воде экспериментальных микроекосмов измерялись флуоресцентным методом. Доказано, что измеряемые этим методом концентрации ионов Al снижались быстрее, чем в контрольных системах без растений. В среднем по двум микроекосмам с побегами было удалено около 70% алюминия по сравнению с контрольными микроекосмами без растений. Макрофит *C. palustris* не сохранил жизнеспособность при загрязнении воды раствором алюминия. Первые признаки фитотоксичности появились после семи суток инкубации (1 неделя). Полная гибель макрофитов зафиксирована на 17-е сутки. В связи с частыми утечками алюминия с различных производств можно отметить, что изложенные результаты проведенных опытов являются актуальными и расширяют сведения о роли биоты в самоочищении воды и формировании ее качества. Полученные данные указывают на возможную перспективность использования *C. palustris* в целях фиторемедиации.

Ключевые слова: алюминий, водные микроекосмы, фиторемедиация, водные макрофиты, *Callitriche palustris*, флуоресценция, загрязнение воды, пресная вода, очистка воды.

Введение

Во многих областях практики возникает задача лучше понимать и прогнозировать химико-биотические взаимодействия с участием химических веществ, загрязняющих окружающую среду, в том числе водную [4]. Химико-биотические взаимодействия в биосфере [9] исследовались на многих объектах, например, в случае различных неорганических и органических поллютантов с водными макрофитами [5, 6, 8, 10].

В выполненном исследовании изучалось взаимодействие алюминия с водным макрофитом *Callitriche palustris* L. на предмет токсичности этого металла и удаления его из воды.

Алюминий является загрязняющим окружающую среду металлом. Только за 2010 год есть несколько при-

меров загрязнения водоемов экстремально высокими концентрациями алюминия [5].

В 2010 году Западно-Сибирский металлургический комбинат (ЗСМК) сбрасывал сточные воды в реку Черная Речка и озеро Узкое без надлежащей очистки, с превышением допустимой концентрации загрязняющих веществ. После сброса сточных вод концентрации взвешенных веществ, азота аммонийного и алюминия были превышены [7].

Алюминиевая болезнь, при которой нарушается структура тканей растений, является смертельной. В кислых сточных водах угольных шахт алюминий достигает концентраций, смертельных для водных организмов. Существенную роль в загрязнении окружающей среды ионами Al играют и кислотные дожди. Содержание алюминия в водоисточниках колеблется в широких пределах от 2,5 до 121 мкг/дм³. При закислении водоема нерастворимые формы алюминия переходят в растворимые, что способствует резкому повышению его концентрации в воде. Присутствие в воде алюминия в концентрациях, превышающих 0,2 мг/л, способно вызвать выпадение в осадок хлопьев гидрохлорида алюминия, а также изменение цветности воды [5].

© 2019 г. Поклонов В.А.

* **Автор для переписки:**

Поклонов Владислав Александрович

канд. биол. наук, доцент кафедры общей и региональной геоэкологии географо-экологического факультета Московского государственного областного университета

E-mail: warvir@rambler.ru

При закислении водоема нерастворимые формы алюминия переходят в растворимые, что способствует резкому повышению его концентрации в воде. Присутствие в воде алюминия в концентрациях, превышающих 0,2 мг/л, способно вызвать выпадение в осадок хлопьев гидрохлорида алюминия, а также изменение цветности воды.

Алюминий широко применяется в электротехнике, стекловарении, военной промышленности, аэрокосмической отрасли, ракетной технике, пищевой промышленности (добавка Е173), при производстве ювелирных изделий, столовых приборов, как добавка в другие сплавы и т.д. [1].

Рекомендуемая ВОЗ концентрация алюминия 0,2 мг/л обеспечивает компромиссное решение между практическим применением солей алюминия при очистке воды и обесцвечиванием воды в распределительной сети. В Российской Федерации ПДК алюминия и его соединений в питьевой воде — 0,2 мг/л. В России ПДК алюминия может быть установлена на уровне 0,5 мг/л главным государственным санитарным врачом по соответствующей территории для конкретной системы водоснабжения, класс опасности алюминия — 3 (умеренная опасность) [2].

Фиторемедиация — это комплекс методов очистки сточных вод и водных объектов при использовании (в данном случае) водных растений. Изучение экологии водных организмов (гидробионтов) выявило многие новые примеры того, как организмы воздействуют на физические и химические параметры окружающей среды, в том числе на свойства гидросферы [3].

Существует взаимосвязь между биотой и качеством воды, в которой функционируют комплексные механизмы самоочищения воды. Большая роль в этой взаимосвязи принадлежит биоте. В работах [11–14] исследовали воздействие сточных вод, содержащих алюминий, на корни, побеги, механизмы питания, фотосинтеза и роста водных растений в условиях гидропоники. В этих опытах наблюдали также за накоплением ионов алюминия в тканях макрофитов.

Есть информация о воздействии алюминия на покрытосеменные растения. Незначительный фитотоксический эффект алюминий оказывал на проростки кукурузы (выращенные в водной среде) в концентрации 2 г/л, как пишут Yang Z. et al. [15].

Цель настоящего исследования — изучить токсичность и динамику концентраций ионов алюминия в водной среде микрокосмов, содержащих высшее водное растение *Callitriche palustris* Linne (Болотник болотный

или обыкновенный; водяная звездочка; семейства Подорожниковые: *Plantaginaceae* Linne).

Данный эксперимент по изучению взаимодействия *C. palustris* и ионов алюминия в микрокосмах проводится впервые.

Материалы и методы

Побеги водного растения *C. palustris* были собраны в водоеме (пруд в 100 км к востоку от Москвы) на экологически чистой территории и были промыты дистиллированной водой.

Для приготовления раствора соли алюминия использовали дистиллированную воду. Алюминий растворяли в серной кислоте по государственному стандартному образцу (получился сульфат алюминия). Концентрация металла в растворе составила 25 мг/л. В растворе имело место превышение ПДК по Al для водных объектов хозяйственно-питьевого водопользования, культурно-бытового водопользования и для питьевой воды. Раствор имел кислотность (рН=6,0). При инкубации в этом растворе макрофитов рН повысился до 7,1–7,5 в разных микрокосмах.

В опыте использовали полученный исходный раствор алюминия. Вносилось по 100 мл раствора Al в каждый микрокосм, кроме 3А (табл. 1). Таким образом, ПДК Al в воде микрокосмов было превышено в 13 раз. Во всех микрокосмах с добавлением Al находилось по 900 мл отстоянной водопроводной воды (ОВВ).

В качестве контроля были взяты микрокосмы № 1А, 1В с ОВВ, куда вносился раствор алюминия, без макрофитов (см. табл. 1). Для дополнительного контроля жизнеспособности растений в чистой воде (ОВВ) инкубировался сосуд с макрофитами без добавления металла (Al). Побеги *C. palustris* находились в микрокосме № 3А.

В микрокосмы № 2А, 2В с добавлением раствора алюминия вносились побеги макрофитов *C. palustris*. Вес внесенных побегов дан в таблице 1. Объем раствора в каждом сосуде составлял 1000 мл (см. табл. 1).

По критериям оценки токсического загрязнения водных экосистем, вода в микрокосмах считалась высокотоксичной.

Инкубация происходила в лабораторных условиях, температура воды в микрокосмах варьировала от 12 до 19 °С, опыт происходил при естественном фотопериоде. Инкубация длилась 21 сутки, хронология инкубации приведена в таблице 2.

Состав микрокосмов

№ микрокосма	Название растения	Биомасса, сырой вес, г	ОВВ, мл	Добавка Al, мл
1А	—	Без макрофитов	900	100
1В	—	Без макрофитов	900	100
2А	<i>Callitriche palustris</i>	49,5	900	100
2В	<i>Callitriche palustris</i>	53,2	900	100
3А	<i>Callitriche palustris</i> (контроль)	20,9	1000	Нет добавления раствора алюминия

Таблица 2

Хронология инкубации (даты взятия проб воды)

День недели	Календарное число	Длительность инкубации, сутки	Температура воды в микрокосмах, °С
ЧТ	19.10.2017	0	12
ЧТ	26.10.2017	7	17
ВС	5.11.2017	17	19
СБ	9.11.2017	21	19

Для выявления концентрации ионов алюминия в воде микрокосмов использовали анализатор флюорат-02-5м. Анализатор флюорат-02-5м позволяет флуоресцентным методом измерять массовую концентрацию различных элементов и соединений, в первую очередь, во всех типах вод, а также воздухе, почве, пищевых продуктах.

Результаты и обсуждение

Биотестирование показало высокую степень токсичности алюминия для макрофита *C. palustris*.

В течение первой недели инкубации не наблюдалось признаков фитотоксичности.

В контрольном микрокосме в ходе биотестирования у водных растений не было отмечено никаких признаков неблагополучия (табл. 3).

В микрокосмах с растениями удаление алюминия из воды происходило быстрее, чем в микрокосмах без растений. После первой недели инкубации начались признаки фитотоксичности: неприятный запах, мутность воды, уменьшение тургора. На 7-е сутки были взяты первые пробы воды из микрокосмов, на 17-е сутки — вторые пробы. На 21-е сутки были взяты пробы только из микрокосмов без растений (1А, 1В).

В микрокосмах без растений (1А, 1В) к концу эксперимента (три недели) концентрация алюминия не снизилась ниже 2,23 мг/л (табл. 4).

Таблица 3

Токсические повреждения растений в ходе эксперимента

Название макрофита	№ микрокосма	Спустя 7 суток	Спустя 17 суток	Спустя 21 сутки
<i>Callitriche palustris</i>	2А	Не наблюдалось признаков фитотоксичности	Мутность воды, запах гнили, черная пленка, фиксируется гибель растений	Черная пленка, ярко выраженный запах гнили, растения почернели, сильная мутность воды, опыт завершен
<i>Callitriche palustris</i>	2В			
<i>Callitriche palustris</i>	3А (контроль)	На протяжении всего эксперимента в контрольном микрокосме не наблюдалось признаков неблагополучия		

Концентрация ионов алюминия (мг/л) в воде микрокосмов

Название макрофита	№ микрокосма	Спустя 7 суток	Спустя 17 суток	Спустя 21 сутки
Без растений	1А	2,42	2,36	2,36
Без растений	1В	2,30	2,29	2,23
<i>Callitriche palustris</i>	2А	1,15	0,93	-
<i>Callitriche palustris</i>	2В	1,19	0,89	-

В среднем по двум микрокосмам (2А и 2В) после 17 суток инкубации болотник удалил примерно 70% ионов алюминия из воды микрокосмов по сравнению с контролем (1А и 1В). Последний замер алюминия в воде был осуществлен спустя 17 суток. После этой даты проведение анализов воды из микрокосмов 2А и 2В не представлялось возможным из-за ярко выраженных признаков неблагополучия водной среды экспериментальных систем.

Заключение

При помощи этой работы впервые получены данные о фиторемедиационном потенциале *C. palustris*, который может быть использован на практике для снижения экологической опасности алюминиевого загрязнения водных объектов.

В условиях экспериментальных микрокосмов макрофит *C. palustris* снизил концентрацию Al в воде микрокосмов с 13 ПДК до 4,5 ПДК (2А=0,93; 2В=0,89 мг/л). *C. palustris* не сохранил жизнеспособность при загрязнении воды раствором алюминия и погиб в течение инкубационного периода.

Полученные данные представляют интерес в связи с возможностью определять устойчивость водных экосистем к нагрузкам алюминия. Болотник (*C. palustris*) может использоваться в целях фиторемедиации.

В связи с частыми утечками алюминия с различных производств можно отметить, что изложенные результаты проведенных опытов являются актуальными и расширяют сведения о роли биоты в самоочищении воды и формировании ее качества.

Литература

1. Алюминий. Википедия-свободная энциклопедия. Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Алюминий>.
2. ГН 2.1.5.1315-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов

хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования».

3. Остроумов С.А., Шестакова Т.В., Котелевцев С.В., Соломонова Е.А., Головня Е.Г., Поклонов В.А. Присутствие макрофитов в водной системе ускоряет снижение концентраций меди, свинца и других тяжелых металлов в воде // Водное хозяйство России. — 2009. — № 2. — С. 58–67.
4. Поклонов В.А. Средоулучшающие биотехнологии: *Ceratophyllum demersum* как фактор снижения концентраций тяжелых металлов в воде // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2017. — Т. 13. — № 3. — С. 31–37.
5. Поклонов В.А. Удаление алюминия водными растениями *Ceratophyllum demersum* и *Chara fragilis* из воды экспериментальных экосистем // Экологическая химия. — 2016. — Т. 25. — № 2. — С. 79–85.
6. Поклонов В.А. Фитотоксический эффект бензола в водной среде // Экологический вестник России. — 2015. — № 12. — С. 66–69.
7. Поклонов В.А., Доницева О.И. Очистка воды от ионов алюминия водным растением *Elodea canadensis* на примере экспериментальных фитосистем // Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение. — 2017. — Т. 117. — № 9. — С. 18–22.
8. Поклонов В.А., Остроумов С.А., Шестакова Т.В. Изучение химико-биотических взаимодействий макрофитов (*Utricularia gibba* L., *Echinodorus quadricostatus* Fasset, *Synnema triflorum* Kuntze, *Hydrotriche hottoniiflora* Zucc, *Lilaeopsis* sp.) с тяжелыми металлами (Cd, Zn, Cu, Pb), загрязняющими окружающую среду // Всероссийский журнал научных публикаций. — 2011. — № 3. — С. 10–12.
9. Поклонов В.А., Шестакова Т.В., Остроумов С.А. Изучение фитотоксического воздействия смеси тяжелых металлов на макрофиты // Экологическая химия. — 2018. — Т. 27. — № 3. — С. 117–123.
10. Соломонова Е.А., Остроумов С.А. Изучение устойчивости водного макрофита *Potamogeton crispus* L. к додецилсульфату натрия // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. — 2007. — № 4. — С. 39–42.
11. Abu Bakar A.F., Yusoff I., Fatt N.T., Othman F., Ashraf M.A. Arsenic, zinc, and aluminium removal from gold mine

- wastewater effluents and accumulation by submerged aquatic plants (*Cabomba piauhyensis*, *Egeria densa*, and *Hydrilla verticillata*) // BioM. Res. Intern. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 890803.
12. Gallon C., Munger C., Premont S., Campbell P.G. Hydroponic study of aluminum accumulation by aquatic plants: effects of fluoride and pH // Water, Air, and Soil Pollution. – 2004. – Vol. 153. – P. 135–155.
13. Goulet R.R., Lalonde J.D., Munger C., Dupuis S., Dumont-Frenette G., Premont S., Campbell P.G. Phytoremediation of effluents from aluminum smelters: a study of Al retention in mesocosms containing aquatic plants // Water Res. – 2005. – Vol. 39. – No. 11. – P. 2291–2300.
14. Umebese C.E., Motajo A.F. Accumulation, tolerance and impact of aluminium, copper and zinc on growth and nitrate reductase activity of *Ceratophyllum demersum* (Hornwort) // Journal of Environmental Biology. – 2008. – Vol. 29. – No. 2. – P. 197–200.
15. Yang Z., Chen J., Dou R., Gao X., Mao C., Wang L. Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2015. – Vol. 12. – No. 12. – P. 15100–15109.

RESEARCH OF THE INTERACTION OF ALUMINUM WITH *CALLITRICHE PALUSTRIS* IN THE CONDITIONS OF FRESHWATER EXPERIMENTAL SYSTEMS

V.A. POKLONOV

Moscow State Regional University, Moscow region, Mytishi

The changes in the concentration of aluminum (Al) salts in the water of experimental ecosystems (microcosms) were studied. In the microcosms, aquatic plants *Callitriche palustris* are incubated. Aquatic organism *C. palustris* is used for the first time in biotesting. The purpose of this research is to study the toxicity and dynamics of the concentration of aluminum ions in the aquatic environment of microcosms containing the higher aquatic plant *Callitriche palustris* L. Aluminum concentrations in experimental microcosm water were measured by the fluorescence method. It is convincingly proven that the concentrations of Al ions measured by this method decreased faster than in control systems without plants. On average, two microcosms with shoots removed about 70% of aluminum compared to control microcosms without plants. Macrophyte *C. palustris* has not maintained viability when water is contaminated with aluminum solution. The first signs of phytotoxicity appeared after seven days of incubation (1 week). The total death of macrophytes is fixed at 17 days. There are frequent leaks of aluminum from various industries. The results of the experiments are relevant. New experiments expand information about the role of biota in the self-purification of water and the formation of its quality. The obtained data indicate the possible prospects of using *C. palustris* for phytoremediation.

Keywords: aluminum, aquatic microcosms, phytoremediation, aquatic macrophytes, *Callitriche palustris*, fluorescence, water pollution, fresh water, water purification.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК И РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ДЕКОРАТИВНЫХ ВИДОВ ЛЬНА (*LINUM GRANDIFLORUM*, *LINUM PERENNE*)

И.И. ТАШЛИЕВА*, Е.А. ГЛАДКОВ

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

Исследованы особенности каллусообразования и регенерации *in vitro* льна крупноцветкового сорт Голубой и льна многолетнего сорт Синий шелк. Разработан биотехнологический метод введения в культуру клеток двух видов льна, используемых в декоративном садоводстве. Индукция каллусных клеток осуществлялась в присутствии 2,4-Д-дихлорфеноксиуксусной кислоты на питательной среде Гамборга (с добавлением 30 мг/л сахарозы). Каллус формировался на поверхности семян плотный, светло-зеленого цвета. При пассировании полученных каллусов на свежую агаризованную питательную среду Гамборга с добавлением α -нафтилуксусной кислоты и 6-бензиламинопурина формировались почки и эмбриониды. Полученные растения-регенеранты льна из почек и эмбрионидов пересаживали на модифицированную питательную среду Мурасиге — Скуга с добавлением НУК.

Ключевые слова: *Linum grandiflorum*, *Linum perenne*, культура клеток, лен.

Введение

Лен широко используется в различных отраслях промышленности, также некоторые декоративные виды льна выращивают для озеленения садовых участков и городов. В декоративном садоводстве используют лен однолетний (крупноцветковый), лен многолетний, лен желтый, лен австрийский, лен жестковолосистый и лен таврический [3]. Лен хорошо смотрится в мавританском газоне, миксбордере и даже в альпинарии, является прекрасным фоном для растений-«солистов». Благодаря неприхотливости ухода, морозостойкости, относительной засухоустойчивости он может иметь широкое использование в декоративном озеленении.

Многие декоративные красивоцветущие виды и сорта растений, используемые в городском озеленении и декоративном садоводстве, не введены в культуру клеток. Вместе с тем культура изолированных тканей находит применение в решении вопросов прикладного характера, в частности, использовании в биотехнологии для создания новых форм и сортов, например, для повышения устойчивости к экологическим стрессам [5]. Результат культивирования зависит от баланса фитогормонов, типа экспланта, минерального состава среды, физических ус-

ловий и длительности инкубации, способности вида или сорта к регенерации и других факторов [1].

Цель исследования — разработка методов индукции каллусогенеза, регенерации и корнеобразования *Linum perenne*, *Linum grandiflorum* в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

В качестве исходного экспериментального материала были использованы семена льна многолетнего сорт Синий шелк, лен крупноцветковый сорт Голубой.

Изолирование и стерилизация эксплантов. Семена стерилизовали однократной обработкой спиртом с последующей стерилизацией раствором, содержащим гипохлорит натрия (15–30%) в течение 15 минут, затем семена три раза промывали стерильной дистиллированной водой. Оптимальное время стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и зараженности фитопатогенами. Каллус образовывался из прорастающих семян.

Условия культивирования. Для индукции каллусообразования и регенерации применяли агаризованные питательные среды Мурасиге — Скуга (МС) [10] и Гамборга (В5) [9] в сочетании с 30 мг/л сахарозой. Эти среды были модифицированы. В качестве регуляторов роста в питательные среды добавляли 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), α -нафтилуксусную кислоту (НУК), 6-бензиламинопурин (БАП) в различных концентрациях и комбинациях [4, 6].

© 2019 г. Ташлиева И.И., Гладков Е.А.

* Автор для переписки:

Ташлиева Илина Игоревна

научный сотрудник ФГБУН Институт физиологии растений РАН

E-mail: ii_tash@mail.ru

Частоту каллусообразования определяли в процентах как отношение числа образовавшихся каллусов к общему числу эксплантов, помещенных на питательную среду; частоту побегообразования — отношением каллусов с образовавшимися на них побегами к общему числу каллусов на среде для морфогенеза.

Культивирование проходило в контролируемых условиях: при дневной температуре 23–25 °С и ночной 18–20 °С. Продолжительность фотопериода составляла 12 часов при интенсивности освещения 350 мкмоль/м²с.

Результаты и обсуждение

Эффективная система каллусогенеза и регенерации растений является обязательным условием успешного применения экобиотехнологических подходов.

На первом этапе работы были оптимизированы условия индукции каллусообразования из эксплантов. Семена исследуемых сортов размещали в асептических условиях на питательных средах МС и В5 с добавлением 2,4-Д в концентрации 1–10 мг/л.

2,4-Д индуцировал процесс дедифференцировки клеток и способствовал пролиферации каллуса. Время образования каллуса составляло 14–20 дней [4]. Наибольший процент эмбрионного каллуса для льна крупноцветкового сорта Голубой и льна многолетнего сорта Синий шелк был получен на питательных средах В5 с добавлением 6 мг/л 2,4-Д и МС с 8 мг/л 2,4-Д (табл. 1). В этих условиях образовывался эмбрионный каллус светло-зеленого цвета, средней плотности.

Таблица 1

Влияние 2,4-Д на частоту образования эмбрионного каллуса из эксплантов

2,4-Д, мг/л	Лен крупноцветковый сорт Голубой		Лен многолетний сорт Синий шелк	
	Среда МС	Среда В5	Среда МС	Среда В5
1	10,2±0,5	30,5±2,7	9,4±0,6	27,8±1,5
2	35,0±2,3	29,4±3,6	38,0±2,7	36,6±2,9
4	40,2±4,0	56,4±7,8	56,8±4,0	59,2±3,2
6	57,1±6,0	60,0±6,1	63,3±6,5	69,1±5,3
8	75,4±8,4	53,8±5,6	67,4±8,1	73,2±5,0
10	44,0±3,3	40,2±4,2	45,0±3,6	51,4±4,7

Для стимуляции образования исходных регенерантов каллус пересаживали на питательную среду с добавлением 1–2 мг/л БАП и 0,1–1 мг/л НУК. Образование наибольшего количества побегов из эмбрионного каллуса наблюдали при культивировании на питательной среде В5 при концентрациях БАП 1 мг/л и НУК 0,1 мг/л, через 2–3 пассажа (табл. 2).

Таблица 2

Влияние БАП и НУК на частоту регенерации растений из эмбрионного каллуса

БАП	НУК	Лен крупноцветковый сорт Голубой		Лен многолетний сорт Синий шелк	
		Среда МС	Среда В5	Среда МС	Среда В5
1	-	20,1±1,9	32,2±3,5	18,4±2,1	34,2±3,8
1	0,1	40,5±2,8	60,1±4,1	42,1±2,7	63,5±4,9
1	0,5	37,4±4,6	52,3±3,8	36,4±3,9	50,8±5,2
1	1	10,2±0,6	15,2±1,8	11,2±1,6	14,2±1,6
2	0,1	35,5±3,4	47,0±3,3	32,5±3,7	46,4±4,5
2	0,5	25,3±2,7	28,8±2,6	24,9±2,8	30,7±2,8

Увеличение концентраций ауксина (НУК более 0,1 мг/л) приводило к снижению регенерационной способности каллусной ткани. Подобный эффект отмечен в работах по льну-долгунцу, где наблюдалось существенное снижение частоты образования побегов на семядольных эксплантах [2]. Положительный эффект сочетания БАП и НУК на морфогенез также был показан для льна-долгунца [7, 8]. Например, при регенерации побегов на сегментах гипокотыла большинства генотипов льна масличного оптимальная концентрация фитогормонов была в пределах 1–2 мг/л БАП и 0,02–0,1 мг/л НУК [7].

Для дальнейшего развития побегов и образования корней регенеранты переносили в пробирки и использовали питательную среду МС с содержанием половинной концентрации минеральных компонентов, добавлением сахарозы в концентрации 10–15 мг/л и НУК в концентрации 0–1 мг/л. Также использовали два варианта плотности среды с содержанием агар-агара (0,7 г/л) и без добавления агар-агара (побеги размещались на фильтровальной бумаге).

Культивирование на среде с добавлением НУК (до 0,5 мг/л) стимулировало ризогенез, к концу 2-го пассажа у значительной части побегов образовывались

корни: при концентрации 0,1 мг/л — 63,8%, 0,5 мг/л — 52,4% (среда без агар-агара). Развитие корней на жидкой среде происходило быстрее, чем на агаризованной. Оптимальными условиями для ризогенеза было культивирование проростков на фильтровальной бумаге, погруженной в питательную среду $\frac{1}{2}$ МС с добавлением НУК в концентрации 0,1 мг/л.

Заключение

Таким образом, разработан биотехнологический метод введения в культуру клеток и регенерации растений двух видов льна, используемых в декоративном садоводстве. В разработанном методе удалось получить высокий процент каллусообразования и регенерации растений.

Часть работы была выполнена в Московском государственном университете инженерной экологии, который на данный момент реорганизован.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. — М.: Наука, 1975. — С. 1–50.
2. Каляева Н.М., Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И. Особенности регенерации льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Биотехнология. — 2000. — № 6. — С. 34–40.
3. Колесникова Е.Г. Газоны. Элементы садового дизайна. — М.: КЛАДЕЗЬ-БУКС, 2010.
4. Литвинова И.И., Гладков Е.А. Введение в культуру клеток растений, используемых в качестве кормовых, лекарственных и декоративных, для получения стрессоустойчивых форм // Сельскохозяйственная биология. — 2012. — № 4. — С. 94–99.
5. Литвинова И.И., Гладков Е.А., Гладкова О.В., Долгих Ю.И. Повышение устойчивости *Brachycome iberidifolia* и *Festuca rubra* к загрязнению почв ионами меди // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. — 2016. — № 18(5–1). — С. 160–162.
6. Литвинова И.И., Гладков Е.А., Гладкова О.Н. Способ введения в культуру клеток льна многолетнего. Патент № 2506741, Бюл. № 5, 2014.
7. Поляков А.В. Биотехнология в селекции льна: Монография. — Тверь, 2000. — 139 с.
8. Шиша Е.Н., Емец А.И., Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Карпель Н.А., Блюм Я.Б. Изучение регенерационной способности и корнеобразования у сортов льна-долгунца украинской и белорусской селекции // Физиология и биохимия культурных растений. — 2011. — Т. 43(1). — С. 57–63.
9. Gambourg O.L., Elevegh D. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. — 1968. — Vol. 46. — P. 417–421.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. — 1962. — Vol. 15. — P. 473–476.

DEVELOPMENT OF THE METHOD OF INTRODUCTION TO CELLS CULTURE AND PLANT REGENERATION OF DECORATIVE FLAX (*LINUM GRANDIFLORUM*, *LINUM PERENNE*)

I.I. TASHLIEVA, E.A. GLADKOV

Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Moscow

The features of callus formation, regeneration and rooting in vitro of *Linum grandiflorum* and *Linum perenne*, are investigated. Induction of callus cells were on Gamborg medium with 2,4 D-dichlorophenoxyacetic acid. Calluses were formed on the surface of the seed. Calluses were light green color. For regeneration, the calluses were transplanted on fresh Gamborg medium with the addition of α -naphthylacetic acid and 6-benzylaminopurine. Then regenerants were transplanted on a modified Murashige-Skoog the addition of NAA for further development and rooting.

Keywords: Linum perenne, Linum grandiflorum, cell culture.

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ УРБАНОЗЕМОВ. ПЕРСПЕКТИВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ТОКСОКАРОЗА

О.Б. ЖДАНОВА^{1,2,3}, С.П. АШИХМИН³, Л.А. НАПИСАНОВА¹, Е.С. КЛЮКИНА⁴,
А.Г. МЕШАНДИН⁵, В.С. БОЛДЫРЕВ^{5*}, С.Ю. БОГОСЛОВСКИЙ⁵

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт паразитологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия; ²Пизанский университет, Пиза, Италия; ³ФБГОУ ВО Кировский государственный медицинский университет, Киров, Россия; ⁴ФБГОУ ВО 1-й Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, ⁵ФБГОУ ВО Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана (Национальный исследовательский университет), Москва, Россия

Токсокароз — инфекция, вызванная инвазированием личинками круглых гельминтов собак *Toxocara canis* или кошек *Toxocara cati*. *Toxocarosis* — один из самых опасных зоонозов плотоядных животных, так как инвазия вызывает у человека заболевание, которое может сопровождаться поражением печени, сердца, легких, мышц, глаз и головного мозга. И хотя токсокароз человека главным образом обусловлен *Toxocara canis* и *Toxocara cati* — основными разновидностями нематод собак и кошек, тем не менее в ряде областей также определенное число диких псовых и кошачьих могут быть заражены *Toxocara canis* и *Toxocara cati*. Эти популяции могут играть роль в поддержании паразита, а урбанизация диких животных способствует экологическому загрязнению почв. В настоящей работе заражение содержащихся в клетках пушных зверей и домашних собак нематодой *T. canis* было исследовано в некоторых областях России и Италии. Показано, что почва парков и детских площадок часто загрязняется яйцами токсокар. Несмотря на то, что животные как источник инфекции играют ведущую роль в человеческой инфекции, инвазия их токсокарой обычно протекает бессимптомно. На основании полученных данных делается вывод, что именно поэтому иммунологическая, гематологическая и копрологическая диагностика необходима у плотоядных животных. Кроме того, для предупреждения заболеваемости токсокарозом нужно проводить дезинфекцию почв.

Ключевые слова: токсокароз, почвы, заражение, дезинфекция, профилактика.

Введение

Почва и грунты представляют собой не только среду для производства продовольственных продуктов и предметов одежды, но и также являются источником питьевой воды. Помимо этого, земля является основной средой обитания человека. В связи с этим только чистая земля (чистые почва и грунт) служат одним из определяющих факторов здоровья человека. Однако большинство почв постоянно находится под воздействием деятельности человека, представленной в форме сельскохозяйственного производства, промышленности, добычи различных минералов, переработки мусорных отходов, накапливания загрязняющих веществ, образу-

ющихся первично в атмосферных выбросах при производстве тепла и энергии, промышленной деятельности, транспортного движения, сжигания мусора и т.д. В результате появляются новые виды грунта: урбаноземы и индустриземы.

Индустриземы представляют собой строго ограниченные территории, в то время как урбаноземы формируются на антропогенно нарушенных территориях и достигают огромных размеров в мегаполисах и прилегающей к ним территории. В этих почвогрунтах появляются инородные включения, имеющие искусственный гумусированный горизонт. В целом, городские почвы выполняют различные экологические функции, главные из которых: произрастание зеленых насаждений, способность адсорбировать в толще загрязняющие вещества, а также удерживать их от проникновения в почвенно-грунтовые воды и от поступления в виде пыли в городской воздух. Почва, находящаяся в экосистеме города, обладает как общими чертами некоторого профильного строения с зональными почвами, так и специфическими

© 2019 г. Жданова О.Б., Ашихмин С.П., Написанова Л.А., Ключкина Е.С., Мешандин А.Г., Болдырев В.С., Богословский С.Ю.

* **Автор для переписки:**

Болдырев Вениамин Станиславович

кандидат технических наук, доцент, МГТУ им. Н.Э. Баумана

E-mail: veniamin_bk@mail.ru

чертами: молодость профиля, преобладание насыпного слоистого сложения антропогенного происхождения с особенными включениями. Профиль городских почв часто растет вверх за счет антропогенного поступления материала. Основное отличие городских почв от зональных состоит в наличии диагностического горизонта «урбик» (от слова urbanus — город). Это — поверхностный насыпной, перемешанный горизонт, часть культурного слоя с примесью антропогенных включений (строительно-бытового мусора, промышленных отходов, отживших растений) более 5%, мощностью более 5 см. Его верхняя часть, как правило, гумусирована. Урбаноземы не только в большей степени подвергаются воздействиям человека, но и находятся с ним в наиболее тесном контакте. Именно почва городов способна накапливать весьма опасные для здоровья человека загрязняющие вещества, например, тяжелые металлы, патогенные бактерии, споры грибов и простейших и яйца гельминтов, в частности, токсокар [1, 12]. Токсокароз — заболевание, вызываемое гельминтом токсокарой, имеет всемирное распространение, представляет опасность для человека, особенно для маленьких детей. Это паразитарное заболевание, вызываемое миграцией личинок аскарид животных семейства псовых (*T. canis*). Характеризуется длительным рецидивирующим течением, иммунопатологическими и полиорганными поражениями.

Биологическая систематика паразита: Тип — круглые черви; Класс: *Nematoda*; Отряд: *Spirurida*; Семейство: *Anisakidae* (*Toxocaridae*); Род: *Toxocara*; Вид: *Toxocara canis*, *Toxocara mystax*.

Toxocara canis — нематода средней величины, самцы длиной 5–10 см, самки 10–18 см. На головном конце имеется три губы и кутикулярные крылья. Между пищеводом и кишечником имеется так называемый желудочек, являющийся характерным признаком представителей семейства *Anisakidae*. Яйца средней величины (0,068–0,085×0,064–0,072 мм), слегка овальной формы, желтоватого цвета, незрелые; наружная оболочка яиц ячеистая [10]. Впервые возможность паразитирования у человека несвойственных ему видов аскарид предположил F. Fülleborn в 1921 г. [6, 12]. Средняя пораженность кишечным токсокарозом собак, обследованных на различных континентах, составляет свыше 15%, но в некоторых регионах достигает 93%. По данным сероэпидемиологических исследований, от 2 до 14% обследованных практически здоровых лиц в различных очагах токсокароза имеют положительные иммунологические реакции на токсокароз. У человека паразитирует исключительно личиночная стадия: у зараженных

токсокарами чаще наблюдаются аллергические реакции на шерсть животных, бронхиальная астма, лихорадка, свистящее дыхание, кашель, гепатомегалия, поражение органов зрения с возможным развитием слепоты [6, 9]. В средней полосе РФ яйца токсокар могут сохраняться жизнеспособными в почве в течение всего года, хорошо перезимовывая под снегом. При температуре ниже -15 °С яйца не развиваются и находятся в состоянии анабиоза. Период развития яиц длится около 5 месяцев (с мая по сентябрь), когда температура и влажность почвы благоприятны. Яйца токсокар сохраняются в почве жизнеспособными в течение нескольких лет в связи с их устойчивостью к различным физическим и химическим факторам. К.И. Скрябин находил живые яйца токсокар даже после одиннадцатилетнего хранения их в 3% растворе формалина [6]. Исходя из вышесказанного, очевидно, что почвы играют огромную роль в современных экосистемах. Исследованию почв городов, в том числе паразитологическому, давно уделяется большое внимание в России и за рубежом.

Основными задачами эколого-паразитологического мониторинга почв является изучение особенностей формирования структуры почв, комплексов показателей различных свойств и загрязнений, аккумулирующихся в верхнем слое почвы и включающихся в почвенно-обменные процессы. Цель данной работы заключается в оценке степени риска заражения человека токсокарозом через домашних и диких животных (плотоядных).

Материалы и методы

Проведены иммунологические (иммуноферментный анализ — ИФА, реакция кольцепреципитации в капилляре — РКПК) и гельминтологические исследования по Фюллеборну и Котельникову — Хренову (в модификации ВИГИС им. К.И. Скрябина) в России и в Италии. Исследовано 150 проб сыворотки псовых доноров, любезно предоставленных сотрудниками ветеринарных лабораторий Пизанского университета, российских зверохозяйств (Вятка, биостанция ВНИИОЗ), владельцами животных и врачами цирков. Выявление яиц гельминтов в фекалиях плотоядных и в почве проводили в городах (Москве, Кирове, Флоренции, Пизе, Ливорно и др.) и в пригородах методом флотации по Фюллеборну. Помимо исследования обезличенных фекалий, исследовали почву на территории парков, скверов, детских площадок, пляжей. Пробы почвы брали в 10 местах по 10 г с территории объекта, как с поверхности (1–2 см), так и с глубины (8–10 см).

Результаты и обсуждение

В Москве и Московской области среди 1847 служебных собак в возрасте от 1 до 9 лет токсокароз выявили у 2,3% животных, при общей их зараженности гельминтами 28,2%. У цирковых животных обнаруживали преимущественно *T. cati*, экстенсивность инвазии (ЭИ) составила 1,2%. При изучении обсемененности почвы из песочниц дворовых площадок в Москве в начале XXI века было установлено, что в 52,5% случаев они загрязнены яйцами токсокар, однако более поздние исследования (2015–2018 гг.) показали резкое снижение наличия яиц в пробах до 4–5% [5, 9]; в различных пробах городов Италии яйца токсокар обнаружить не удалось. Хотя собаки часто заражаются при интенсивности инвазии (ИИ) средней степени, подтвержденными в ИФА: более 15% проб от 135 собак-доноров (любезно предоставленными сотрудниками Пизанского университета) были положительными. С одной стороны, это можно объяснить тем, что высокая температура в городах Италии (более 45 °С) и длительное солнечное излучение являются губительными для яиц; с другой стороны, как правило, после 6–8 месяцев яйца с фекалиями собак не выделяются, а щенки владельцы предпочитают не выгуливать на улицах. При проведении копроовоскопических исследований в обезличенных пробах яйца токсокар обнаруживали в 15,5%, однако в пробах фекалий от пушных зверей, содержащихся в клетках, этот показатель возрастал более чем на 90% до плановой дегельминтизации; через несколько дней после нее он снижался у дегельминтизированного поголовья. По всей видимости, это связано с тем, что в хозяйствах исследовали молодняк до 6 месяцев, а возраст животных при исследовании обезличенных фекалий установить не представляется возможным. К сожалению, следует отметить, что владельцы зверохозяйств неохотно идут на контакт и отказываются проводить дальнейшие исследования, направленные на борьбу с токсокарозом. Хотя ранее яйца токсокар находили в фекалиях всех животных зверохозяйств (песцы, серебристо-черные и рыжие лисицы и др.) и лишь у кунных (хорь и норка) яйца не были обнаружены [5]. В РКПК положительно реагировали 35% проб сыворотки крови плотоядных животных в зверохозяйствах, за исключением кунных [5, 6, 12]. Кристаллоскопический анализ сыворотки не отличался от здоровых животных, в отличие от такового при трихинеллезе и аляриозе, при которых наблюдали изменение как основных, так и дополнительных параметров [7].

Проведенный анализ показал, что климатические и почвенные условия средней полосы РФ являются более благоприятными для развития яиц гельминтов, чем почвы Италии; поэтому проблеме биологического загрязнения почвы и ее дегельминтизации необходимо уделять особое внимание. Оптимальными для развития яиц представляются глинистые, влагоемкие почвы, температура 24–30 °С, относительная влажность воздуха 85%, почвы — выше 20%. При этих условиях личинка в яйце развивается за 5–8 суток. Длительность развития личинки до инвазионной стадии определяется главным образом температурой почвы (обычно имеется в виду температура на глубине 5–10 см, где концентрируется основная масса яиц). Нижний температурный порог развития яиц токсокар +10–13 °С, при температуре +37 °С яйца погибают через 5 суток, а при +55 °С — в течение 7 мин. Для развития яиц до инвазионной стадии требуется 160–183 градусо-суток. При среднесуточной температуре, например, +13–18 °С, на это потребуется около 36 суток, а при температуре +25 °С — около 15 суток. Отмирание яиц начинается при температуре ниже -15 °С. Минимальная относительная влажность почвы для развития яиц токсокар составляет 5–8%, развитие яиц токсокар является фотозависимым процессом, яйца токсокар не могут развиваться успешно в темноте, однако прямые солнечные лучи оказывают на них губительное действие [4, 12, 14]. В средней полосе РФ яйца могут сохраняться жизнеспособными в почве в течение всего года, хорошо перезимовывая под снегом. При температуре ниже -15 °С яйца не развиваются и находятся в состоянии анабиоза. Период развития яиц длится около 5 месяцев (с мая по сентябрь), когда температура и влажность почвы благоприятны. Яйца токсокар сохраняются в почве жизнеспособными в течение нескольких лет. Таким образом, встает вопрос о дезинвазии урбаноземов. Однако большинство используемых дезинфектантов либо не действует на яйца токсокар, либо необходимо использовать их повышенные концентрации: так, например, в 3%-ном растворе формалина яйца сохраняются живыми до 11 лет [3, 6, 13].

Учитывая высокую устойчивость яиц в растворах дезинфектантов, мы предприняли попытку дезинвазии урбаноземов производным азотистоводородной кислоты — азидом натрия ($Na - N = N^+ = N^-$). Для этого в 0,1–0,5% раствор азиды натрия вносили яйца токсокар и наблюдали за их развитием. Была отмечена гибель 30% яиц в первые сутки и 63% во вторые сутки инкубирования в растворе 0,3%-ного азиды натрия, в 0,1%-ном растворе яйца оставались без изменений в

течение недели. Однако на 5–7-е сутки темным стало и содержимое яиц, а бластомеры не просматривались. На 14-е сутки начался процесс изменения (искривление, деформация) формы оболочек яиц. Содержимое яиц по-прежнему было темного цвета и не дифференцировалось. Наличие вышеописанных изменений яиц этой серии эксперимента явилось основанием для предположения об их нежизнеспособности.

Следовательно, теоретически 0,1%-ный раствор азид натрия можно рекомендовать для дегельминтизации почвы в местах скопления фекалий собак и кошек. Однако возникает необходимость проверки безопасности препарата для газонных растений и полезной почвенной микрофлоры. В то же время, принимая во внимание то, что гибель более чем 90% яиц через 24 часа происходит только в 0,3%-ном растворе, такой раствор азид натрия можно рекомендовать для дезинвазии фекалий больных токсокарозом животных. В результате проведенных исследований установили высокую эффективность растворов производных азотистоводородной кислоты при относительной безопасности применения их для растений и почвенной микрофлоры. Сроки дезинвазии необходимо рассчитывать, исходя из того, что средняя продолжительность жизни половозрелых особей *Toxocara canis* составляет 4 месяца, максимальная – 6. Самка *Toxocara canis* откладывает более 200 тысяч яиц в сутки, которые выделяются в окружающую среду незрелыми и неинвазионными. Срок созревания яиц зависит от температуры окружающей среды и влажности, в почве они длительное время сохраняют жизнеспособность и инвазионность. В средней полосе РФ яйца токсокар могут сохраняться жизнеспособными в почве в течение всего года, хорошо перезимовывая под снегом. При температуре ниже -15°C яйца не развиваются и находятся в состоянии анабиоза. Период развития яиц длится около 5 месяцев (с мая по сентябрь), когда температура и влажность почвы особенно благоприятны.

Таким образом, дезинвазия урбаноземов в данный период позволит снизить количество инвазионных личинок [1–3]. Снижение степени паразитарного загрязнения урбаноземов даст возможность внести существенный вклад в решение проблемы биобезопасности и паразитарного благополучия населения. Поэтому проводятся исследования по поиску и разработке современных дезинфектантов с достаточным уровнем биобезопасности [11, 15]. При проведении сравнительных полевых исследований с другими дезинфектантами (96% спирт, 4% формалин, растворы карболовой кислоты, спирта) установлено, что наибольшей эффективностью обладал азид натрия в 0,3%-ной концентрации [1, 6]. Следовательно, теоретически азид

натрия можно рекомендовать для дегельминтизации почвы в местах утилизации фекалий плотоядных и грызунов. Однако возникает необходимость проверки безопасности препарата для газонных растений и полезной почвенной микрофлоры. С этой целью были проведены несколько опытов на микроделянках площадью 1 м^2 , урбаноземах г. Кирова в пригородах до 20 км от города и более 20 км. На подготовленные участки в городе высевали смесь газонных трав «SPORT», в пригородах использовали посеvy лядви́нца рогатого и газонных трав «спорт», в удаленных районах исследовали действие на аборигенные травы. До посева и во время вегетации проведена обработка соответствующих вариантов раствором азид натрия 0,3% и 0,5%; 0,5% карболовой кислоты, 4% формалина и спирта.

Исходя из результатов микроделяночного опыта, проведенного в городе, применение азид натрия в концентрации 0,5% нельзя считать безопасным для флоры высших растений, хотя почвенные микробиоценозы угнетения не испытывают; наоборот, наблюдается стимуляция размножения различных групп микроорганизмов: бактерий-аммонификаторов, микромицетов, водорослей и цианобактерий, остальные дезинфектанты действуют губительно и на аборигенную микрофлору. Одним из путей, снимающих стрессовое воздействие азид натрия на высшие растения, может быть предварительная обработка почвы данным препаратом в концентрациях, не превышающих 0,3%, до посева семян и внесение инокулята цианобактерий [6].

Заключение

На основании полученных данных исследования делается заключение, что снижение степени паразитарного загрязнения урбанизированных территорий Российской Федерации позволит внести существенный вклад в решение проблемы профилактики токсокароза. Поэтому необходимо продолжить исследования по поиску и разработке современных дезинфектантов с достаточным овицидным уровнем.

Литература

1. Ашихмин С.П., Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Азид натрия: некоторые физико-химические свойства и потенциальное место в дезинфектологии // Здоровье населения и среда обитания. – 2012. – № 4. – С. 43–45.
2. Горохов В.В., Самойловская Н.А., Успенский А.В., Кленова И.Ф., Пешков Р.А., Пузанова Е.В., Москвин А.С. Прогноз по основным гельминтозам животных на

- территории России // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. — 2015. — № 16. — С. 115–116.
3. Горохов В.В., Успенский А.В., Малышева Н.С., Самофалова Н.А., Малышева Е.В., Власов Е.А., Гладких К.А. Паразитарные зоонозы: состояние проблемы // Ученые записки. Электронный научный журнал Курского государственного университета. — 2012. — № 1. — С. 56–61.
 4. Довгалёв А.С., Щучинова Л.Д., Успенский А.В., Паутов Е.А., Астанина С.Ю. Эпизоотолого-эпидемиологическое и экологическое районирование — элемент системы обеспечения благополучия территории по токсокарозу (на примере Республики Алтай) // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2016. — № 3. — С. 48–52.
 5. Жданова О.Б. Паразитозы плотоядных (патогенез, иммуноморфология и диагностика): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Всероссийский НИИ гельминтологии им. К.И. Скрябина, Москва, 2007. — 43 с.
 6. Жданова О.Б., Ашихмин С.П., Написанова Л.А., Аббасова С.В., Ястреб В.Б. Токсокароз человека и животных. Современный подход к обеспечению биобезопасности почв. (Монография). — Киров, 2018. — 89 с.
 7. Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Особенности свободного кристаллогенеза мочи здоровых и зараженных гельминтами грызунов // Труды Всероссийского НИИ гельминтологии им. К.И. Скрябина. — 2007. — Т. 45. — С. 153.
 8. Масленникова О.В., Жданова О.Б., Мартусевич А.К., Ашихмин С.П., Клюкина Е.С. Распространение *Alaria alata* в Кировской области и некоторые особенности ее сокристаллизации с растворами дезинфектантов // Российский паразитологический журнал. — 2010. — № 3. — С. 73–76.
 9. Успенский А.В. Перспективы развития паразитологии в России // Ветеринария и кормление. — 2017. — № 2. — С. 20–23.
 10. Успенский А.В., Косминков Н.Е. К вопросу номенклатуры возбудителей гельминтозов и вызываемых ими болезней у животных // Российский паразитологический журнал. — 2009. — № 1. — С. 10–14.
 11. Ястреб В.Б., Белоусов М.Н. Ветеринарно-санитарные проблемы содержания собак и кошек в г. Москве / Тезисы докладов научно-практического совещания «Паразитарное загрязнение мегаполиса Москвы». — М., 1994. — С. 53–54.
 12. Genche M., Trald G., Genche C. *Parassitologia veterinaria*. — Casa Ambrosiana, 2015. — 360 p.
 13. Harley J.W. *Veterinary Hematology. A diagnostic Guide*. — St. Louis, Missouri, 2012. — 360 p.
 14. Schaer M. *Clinical medicine of the Dog and Cat*. (2nd edition). — Gainesville, Florida, USA, 2012. — 605 p.
 15. Taylor M.A., Coop R.L. *Veterinary parasitology* (2nd edition). — Blackwell Publishing, USA, 2014. — 209 p.

BIOSAFETY OF URBAN SOIL. PROSPECTS OF PERFECTION OF DIAGNOSTICS AND PREVENTION OF TOXOCARIASIS

O.B. ZHDANOVA^{1,2,3}, S.P. ASHIHMIN³, L.A. NAPISANOVA¹, E.S. KLIUKINA⁴,
A.G. MESHANDIN⁵, V.S. BOLDYREV⁵, S.Yu. BOGOSLOVSKII⁵

¹All-Russian Scientific Research Institute of Helminthology named after Skriabin K.I., Moscow, Russia; ²University of Pisa, Pisa, Italy; ³Kirov State Medical University, Kirov, Russia; ⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; ⁵Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia

Toxocariasis is an infection caused by the infestation of the larvae of round helminths of *Toxocara canis* dogs or *Toxocara cati* cats. Toxocariasis is one of the most dangerous zoonoses of carnivorous animals, since invasion causes a disease in humans that can be accompanied by damage to the liver, heart, lungs, muscles, eyes and brain. Although human toxocariasis is mainly caused by *Toxocara canis* and *Toxocara cati* — the main species of dog and cat nematodes, nevertheless, in some areas also a certain number of wild canine and feline can be infected with *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. These populations can play a role in maintaining the parasite, and the urbanization of wild animals contributes to environmental pollution of the soil. In the present work, the infection of the nematode *T. canis* contained in cages of fur-bearing animals and domestic dogs was investigated in some regions of Russia and Italy. It is shown that the soil of parks and playgrounds is often polluted by toxocara eggs. Despite the fact that animals as a source of infection play a leading role in human infection, their invasion with toxocara is usually asymptomatic. Based on the data obtained, it is concluded that this is why immunological, hematological and scatological diagnostics is necessary in carnivorous animals. In addition, to prevent the incidence of toxocariasis, it is necessary to disinfect the soil.

Keywords: toxocariasis, soil, disinfection, prophylaxis.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *BACILLUS SUBTILIS* НА МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО КИШЕЧНИКА КРЫС

Е.В. СКВОРЦОВ*, РИШ. С. МУХАММАДИЕВ,
РИН. С. МУХАММАДИЕВ, Л.Р. ВАЛИУЛЛИН

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности — Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт», Казань

Проведены исследования бактерий *Bacillus subtilis* для использования их в качестве пробиотического препарата. При оценке эффективности применения пробиотиков исходили из того, что содержание ДНК бактерий в кале пропорционально их содержанию в кишечнике. Анализ количества ДНК бактерий проводили методом ПЦР в реальном времени. Нами были разработаны новые высокоспецифичные праймеры и флуоресцентные зонды к гену *gyrA* (AY663697.1) *B. subtilis*. Разработанный нами метод позволяет устанавливать принадлежность бактерий к виду *B. subtilis* и количественно определять их в образцах кала. Применение препарата отразилось в увеличении количества *B. subtilis* в кишечнике и, как следствие, их ДНК в кале крыс. Возрастание количества бактерий *B. subtilis* сопровождалось снижением численности *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. и *E. coli* в кишечнике. Показана способность бактерий *B. subtilis* оказывать положительное влияние на прирост массы тела крыс.

Ключевые слова: микробное сообщество, кишечник, пробиотики, генетический анализ.

Введение

Применение пробиотиков позволяет повысить продуктивность животных на 15–20%, эффективность лечения желудочно-кишечных заболеваний — на 30–40% и сократить заболеваемость молодняка на 20–30% [8]. Использование пробиотиков в животноводстве становится неотъемлемой частью этого процесса, так как рост и здоровье животных зависят от работы кишечника, синтеза витаминов и аминокислот, переваривания пищи и усвоения всех необходимых витаминов и минералов из корма, утилизации продуктов обмена [4, 11].

Пробиотики становятся все более популярными в качестве одной из альтернатив применения антибиотиков для предотвращения и контроля кишечных патогенов животных. Хотя в настоящее время определено, что пробиотики полезны, но результаты сильно варьируют и информация об их режиме действия и

влияния на желудочно-кишечную микробную экологию ограничена [13].

Основной детерминантой здорового желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) является состав микробной популяции. Пробиотики могут изменять динамику микробной популяции в ЖКТ, создавая более благоприятную микробную популяцию за счет сдвига баланса полезных и вредных микробов [12, 16, 17]. Снижение количества патогенных микроорганизмов в ЖКТ при применении пробиотиков может быть связано с продукцией антимикробных веществ [18] и адгезией пробиотических микробов к кишечному эпителию, что конкурентно оттесняет патогенные микроорганизмы. Наиболее распространенной трансформацией микрофлоры ЖКТ пробиотиками являются увеличение популяций лактобацилл и бифидобактерий [18] и уменьшение популяций колиформных бактерий, в частности, кишечной палочки [14, 15, 18]. Эта картина изменения микрофлоры ЖКТ происходит со всеми типами бактерий, используемыми как пробиотики, например, молочнокислые бактерии [15], спорообразующие бактерии *Bacillus* sp. [10, 18].

Незаменимые представители полезной микрофлоры — это бифидобактерии и молочнокислые бактерии. Вырабатывая молочную и уксусную кислоту, они являются антагонистами по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам [9].

© 2019 г. Скворцов Е.В., Мухаммадиев Риш.С., Мухаммадиев Рин.С., Валиуллин Л.Р.

* Автор для переписки:

Скворцов Евгений Владимирович, к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности — всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт», Казань

E-mail: eskvortsov@rambler.ru

В литературе имеются данные, что применение споровых пробиотиков предупреждает развитие дисбактериозов, способствует стимуляции клеточных и гуморальных факторов иммунитета, повышает неспецифическую резистентность организма, стимулирует регенерационные процессы в организме, нормализует обмен веществ [3]. Спорообразующие бактерии *Bacillus* sp. широко применяются в качестве пробиотиков для лечения заболеваний ЖКТ, так как для человека и животных данные микроорганизмы не патогенны [7].

В настоящей работе была поставлена задача — исследовать влияние пробиотических препаратов *B. subtilis* на микробное сообщество в кишечнике лабораторных крыс.

Для решения этой задачи были необходимы быстрые и точные методы количественного определения исследуемых бактерий в кишечнике в процессе применения этих препаратов.

Следует отметить, что качество стандартных микробиологических методов, по данным наших исследований, очень низкое. Большое количество бифидобактерий погибает в процессе взятия проб и проведения анализов. Результаты анализов сильно зависят от минимальных отличий в процедурах микробиологических операций посева, избежать которых невозможно. Погрешность таких методов превосходит величину эффекта от применения препаратов.

В кишечнике постоянно происходят деление и отмирание существующих там бактерий и их вынос с каловыми массами в живом и мертвом виде. Содержание бактерий в кале пропорционально их содержанию в кишечнике.

Каждый род бактерии имеет свой, присущий только ему набор генов. Сделав количественный генетический анализ сухого вещества кала на содержание соответствующих, специфических генов бактерий, изучив его динамику, можно делать достоверные выводы об эффективности применения пробиотиков. Осуществить такой анализ возможно методом ПЦР в реальном времени. Метод позволяет после амплификации определить количества определенного специфического для исследуемого рода и вида бактерий участка гена.

Цель работы — исследование влияния пробиотического препарата на основе *B. subtilis* на содержание бактерий *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. и *Escherichia coli* в кишечнике лабораторных крыс.

Материалы и методы

Объект исследования. Объектом исследования были белые беспородные крысы-самцы в начальном воз-

расте 4 недели массой 80 ± 9 г. При проведении исследования выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных [5]. В работе использовали штамм бацилл из коллекции музея лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Казанского федерального университета: *Bacillus subtilis* (штамм JH 642).

Для получения пробиотического препарата *B. subtilis* культивировали на L-бульоне в течение 24–72 часов на лабораторных качалках с интенсивностью качания 100 об./мин при температуре 37 °С до содержания 10^7 клеток/мл. Одну дозу препарата принимали равной 10^6 клеток *B. subtilis*.

Опытная группа в количестве 20 беспородных крыс-самцов получала ячмень кормовой с добавками препарата клеток *B. subtilis* в виде культуральной суспензии. Контрольная группа в количестве 20 крыс получала ячмень кормовой, равный по количеству опытной группе, но без добавок пробиотического препарата; количества приведены в таблице 1.

Таблица 1

Рационы кормления и дозы пробиотических добавок *B. subtilis*

Возраст, недели	Контрольная группа	Опытная группа	
	Ячмень грамм/сутки	Ячмень грамм/сутки	Добавки, 1 раз в начале недели
5	10	10	1 доза
6	10	10	
7	15	15	1.5 дозы
8	15	15	
9	20	20	2 дозы
10	20	20	

Получение каловых суспензий. Кал крыс сушили, взвешивали и растирали в фарфоровой ступке в дистиллированной воде: 1 весовая часть калового материала и 5 весовых частей дистиллированной воды.

ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Суммарную ДНК выделяли набором «ДНК-сорб-В» (Интерлабсервис, Россия). При этом во все образцы добавляли внутренний контрольный образец, который позволяет отслеживать потери нуклеиновых кислот в процессе пробоподготовки и оценивать процесс ПЦР в целом. В пробирки вносили по 300 мкл лизирующего раствора и по 100 мкл суспензии кала. Пробы перемешивали на вортексе и выдерживали при

65 °С в течение 5 минут, периодически перемешивая. Затем центрифугировали в течение 10 секунд при 5 тыс. об./мин. В каждую пробирку вносили по 25 мкл сорбента. Пробирки с внесенным сорбентом перемешивали на вортексе, инкубировали в течение пяти минут при периодическом перемешивании. Сорбент осаждали в пробирках при 5 тыс. об./мин. в течение 5 минут. Супернатант удаляли. ДНК, прикрепленные на сорбенте, промывали 2 раза при помощи промывочных растворов. Осадок сорбента сушили при 65 °С в течение 10 мин. Затем в пробирки добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК.

С использованием данных Интернет-ресурса Genbank, программы Vector NTI и Интернет-ресурса Blast были разработаны новые высокоспецифичные праймеры и флуоресцентные зонды к гену *gyrA* (AY663697.1) *B. subtilis*. Разработанный нами метод позволяет устанавливать принадлежность бактерий к виду *B. subtilis* и количественно определять их в образцах кала. Анализ *B. subtilis* в пробах проводили методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени. Количественную оценку ДНК проводили по калибровочным кривым, построенным по результатам ПЦР-детекции серии стандартных образцов с известным содержанием клеток *B. subtilis*. Содержание клеток в стандартных образцах определяли анализом мутности серии разведений клеток *B. subtilis* и сопоставлением ее со стандартами мутности известной концентрации. Количество ДНК бактерий *Bifidobacterium* sp. и *Lactobacillus* sp. в анализируемых пробах определяли с помощью набора реагентов «Колонофлор» (Альфалаб). Он предназначен для количественной оценки состояния микробиоценоза толстой кишки методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени. Праймеры и зонды набора соответствуют консервативным участкам генов. Для исследований методом ПЦР использовали амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «Т-100 Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad», США).

Статистическая обработка данных. Анализируемые показатели измеряли в 3 повторностях. Экспериментальные крысы в количестве 20 штук в каждой исследуемой группе. В статье приведены средние арифметические данные проанализированных повторов образцов и их стандартные ошибки. Для статистической обработки результатов использовали математический аппарат программы Microsoft Excel. Достоверность

различий между сравниваемыми средними величинами устанавливали, используя t-тест Стьюдента; различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Методом количественного ПЦР анализа проведены исследования содержания ДНК основных родов бактерий в кале лабораторных крыс. Исследования показали, что содержание ДНК исследованных бактерий в кале контрольной группы составляет: *Bifidobacterium* sp. — 8,0–8,5 lg ДНК/грамм, с тенденцией роста в диапазоне 5–10-й недель роста крыс. Количество ДНК *Lactobacillus* sp. 5,5–6,0 lg ДНК/грамм, *E. coli* 6,5–7,1 lg ДНК/грамм. Количество *B. subtilis* было стабильным на уровне 1,5–1,8 lg ДНК/грамм на протяжении срока эксперимента, и это в кале контрольной группы, не получавшей пробиотической добавки *B. subtilis* (рис. 1). Такое содержание ДНК данных бактерий мы приняли за базовое, для проведения дальнейшего анализа влияния пробиотических препаратов *B. subtilis* на прирост массы тела крыс и микрофлору кишечника.

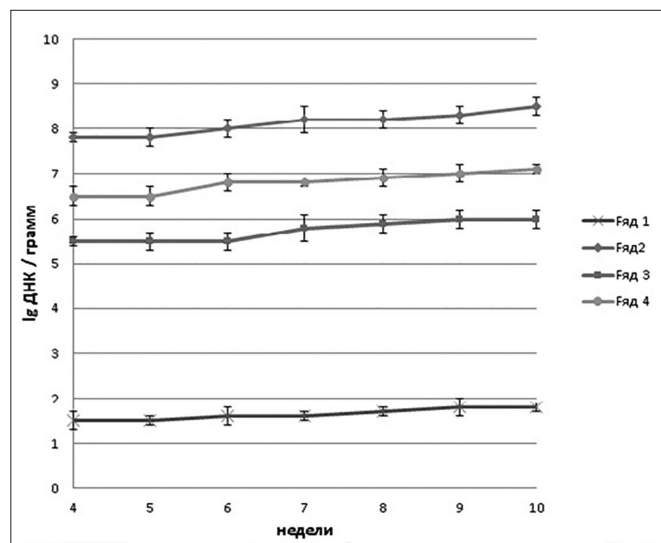


Рис. 1. Количество ДНК *B. subtilis* (ряд — 1), *Bifidobacterium* sp. (ряд — 2), *Lactobacillus* sp. (ряд — 3) и *E. coli* (ряд — 4) в кале контрольной группы крыс в процессе проведения эксперимента

Для прояснения вопроса о сохранности бактерий в процессе прохождения ими желудочно-кишечного тракта был проведен эксперимент с опытной группой крыс. Опытная группа получала ячмень кормовой с добавками препарата *B. subtilis* в виде культуральной суспензии. Контрольная группа получала ячмень кормовой в равном количестве с опытной группой, но без

добавок пробиотического препарата. Время и количество введения в рацион крыс пробиотического препарата приведены в таблице 1. Одна доза препарата содержала 10^6 клеток *B. subtilis*.

Эксперимент проводили с крысами в возрасте 4 недель. Общая продолжительность эксперимента составила 6 недель до возраста крыс 10 недель. По окончании каждой недели исследования анализировали содержание ДНК бактерий в кале методом количественного ПЦР-анализа.

Содержание ДНК бактерий *B. subtilis* в кале опытной группы составило $1,5 \pm 0,1$ lg ДНК/г в начале эксперимента и возросло до $4,0 \pm 0,2$ lg ДНК/г — в конце.

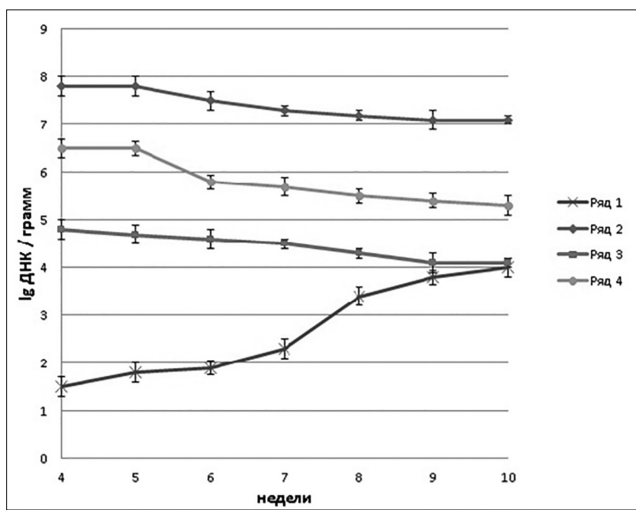


Рис. 2. Количество ДНК *B. subtilis* (ряд — 1), *Bifidobacterium* sp. (ряд — 2) *Lactobacillus* sp. (ряд — 3) и *E. coli* (ряд — 4) в кале опытной группы крыс в процессе проведения эксперимента

На фоне роста количества *B. subtilis* в ходе проведения эксперимента наблюдалось снижение численности *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. и *E. coli* в кале опытной группы крыс (рис. 2).

Введение препаратов бактерий *B. subtilis* в кормовой рацион крыс не приводило к развитию вредных влияний и побочных эффектов. В конце эксперимента у крыс всех групп шерстяной покров густой, глянцевоый. Глаза — блестящие.

Опытная группа, принимавшая препарат *B. subtilis* в виде водной суспензии в культуральной жидкости, продемонстрировала больший привес, чем контрольная. Графики увеличения массы крыс контрольной и экспериментальных групп приведены на рисунке 3. Средняя масса крысы опытной группы в конце эксперимента была равна $264 \pm 4,9$ грамма. Средняя масса крысы контрольной группы в конце эксперимента была равна

$239 \pm 4,8$ грамма. Средняя масса крыс опытной группы в сравнении с контрольной в конце эксперимента была больше на 10,5%.

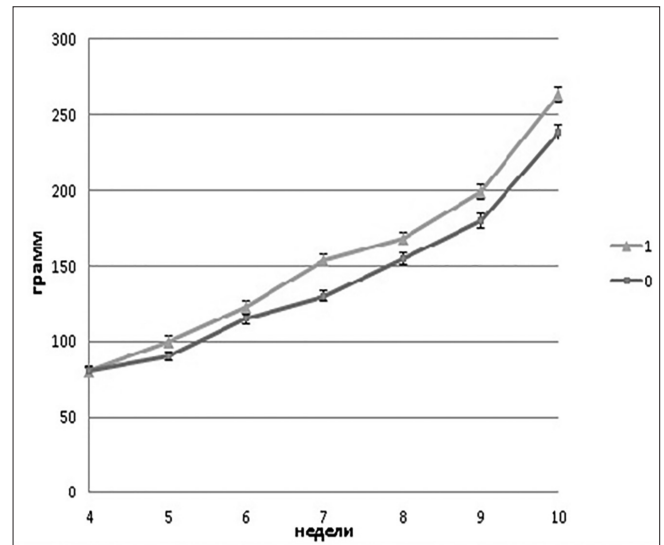


Рис. 3. Рост массы крыс в процессе применения пробиотического препарата *B. subtilis*. (Ряд — 0 — контрольная группа; ряд — 1 — опытная группа крыс)

Обсуждение

Результаты исследования показали, что ДНК бактерий *B. subtilis* обнаруживается в кале крыс, хотя данный род бактерий не считается типичным обитателем кишечника. *B. subtilis* является своего рода транзитной бактерией, постоянно поступающей и выводящейся из пищеварительной системы. Поэтому прижиться в кишечнике *B. subtilis* не может [2]. Между тем количество *B. subtilis* было стабильным на уровне $1,5–1,8$ lg ДНК/грамм на протяжении срока эксперимента, и это в кале контрольной группы, не получавшей пробиотической добавки *B. subtilis* (см. рис. 1).

В настоящее время продолжает обсуждаться вопрос о том, способны ли живые бактерии проникать дальше желудка и выполнять пробиотическую функцию. Результаты исследования показали достоверный рост содержания ДНК *B. subtilis* в кале, а, следовательно, и в кишечнике лабораторных крыс при приеме ими пробиотического препарата бактерий *B. subtilis*. Содержание ДНК в кале возросло до $4,0 \pm 0,2$ lg ДНК/г в конце эксперимента. Следовательно, была подтверждена выживаемость *B. subtilis* при прохождении желудочно-кишечного тракта в виде водной суспензии.

Рост содержания *B. subtilis* сопровождался ускорением роста лабораторных крыс. Ускорение роста

крыс наблюдалось даже при некотором снижении численности *Bifidobacterium* sp. и *Lactobacillus* sp. в кале опытных групп крыс, хотя, по данным ряда источников [1, 6, 9], уменьшение бифидобактерий и молочнокислых бактерий в кишечнике приводит к ухудшению процессов пищеварения и развитию болезнетворной микрофлоры. Это означает, что *B. subtilis* способна функционально замещать эти бактерии в кишечнике без негативных последствий для пищеварения.

Заключение

Таким образом, нами были разработаны новые высокоспецифичные праймеры и флуоресцентные зонды к гену *gyrA* (AY663697.1) *B. subtilis*. Разработанные генетические инструменты позволяют устанавливать принадлежность бактерий к виду *B. subtilis* и количественно, в режиме Real-time PCR определять их в образцах кала. Исследования, проведенные с применением разработанного метода, показали, что при использовании пробиотических препаратов бактерий *B. subtilis* происходит увеличение их содержания в кале крыс и соответственно в кишечнике. Бактерии *B. subtilis* оказывают положительное влияние на рост лабораторных крыс, проявляют отсутствие патогенности и токсичности, несмотря на снижение численности *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. и *E. coli* в кишечнике. Следовательно, препарат на основе *B. subtilis* обнаруживает пробиотические свойства.

Литература

1. Амерханова А.М. Морфологическая изменчивость микроорганизмов рода *Bifidobacterium* // Здоровье населения и среда обитания. — 2012. — № 12(237). — С. 33–35.
2. Воробьев А.А. Микробиология. — М.: Медицина, 2003. — 79 с.
3. Грязнева Т.Н. Биологически активные вещества, продуцируемые бактериями рода *Vacillus* // Лечащий врач. — 2013. — № 4. — С. 54–63.
4. Дементьев Е.П., Лободина Ж.В., Цепелева Е.В. Влияние аэроионизации и пробиотика «лактобактерин» на микроклимат телятника, гематологические показатели и интенсивность роста телят // Международный журнал экспериментального образования. — 2015. — № 11. — Часть 1. — С. 113–155.
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. — СПб.: Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», 2012. — 48 с.
6. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. — М.: Наука, 1975. — 384 с.
7. Ленгелер Й., Древе Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты. — М.: Мир, 2005. — Т. 2. — 496 с.
8. Тараканов В.В., Николичева Т.А., Алешин В.В. Пробиотики. Достижения и перспективы использования в животноводстве // Труды Всероссийского института животных. — 2004. — Т. 3. — С. 69–73.
9. Функ И.А., Иркитова А.Н. Биотехнологический потенциал бифидобактерий // Acta Biologica Sibirica. — 2016. — Т. 2. — № 4. — С. 67–79.
10. Abdelqader A., Irshaid R., Al-fataftah A.R. Effects of dietary probiotic inclusion on performance, egg shell quality, cecal microflora composition, and tibia traits of laying hens in the late phase of production // Tropical Animal Health and Production. — 2013. — Vol. 45. — P. 1017–1024.
11. Ajuwon K. Toward a better understanding of mechanisms of probiotics and prebiotics action in poultry species // Journal of Applied Poultry Research. — 2015. — Vol. 25. — P. 277–283.
12. An B., Cho B., You S., Paik H., Chang H., Kim S., Yun C., Kang C. Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived β -glucan and single strain probiotics // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. — 2008. — Vol. 21. — P. 1027–1032.
13. Fioramonti J., Theodorou V., Bueno L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? // Best Practice and Research Clinical Gastroenterology. — 2003. — Vol. 17. — P. 711–724.
14. Khaksar V., Golian A., Kermanshahi H. Immune response and ileal microflora in broilers fed wheat-based diet with or without enzyme Endofeed W and supplementation of thyme essential oil or probiotic PrimaLac // African Journal of Biotechnology. — 2012. — Vol. 11. — P. 14716–14723.
15. Mountzouris K., Tsirtsikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M., Schatzmayr G., Fegeros K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition // Poultry Science. — 2010. — Vol. 89. — P. 58–67.
16. Mountzouris K.C., Balaskas C., Xanthakos I., Tzivinikou A., Fegeros K. Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella enteritidis* // British Poultry Science. — 2009. — Vol. 50. — P. 467–478.
17. Mountzouris K.C., Tsirtsikos P., Kalamara E., Nitsch S., Schatzmayr G., Fegeros K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities // Poultry Science. — 2007. — Vol. 86. — P. 309–317.

18. Shim Y., Ingale S., Kim J., Kim K., Seo D., Lee S., Chae B., Kwon I. A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers // *British Poultry Science*. – 2012. – Vol. 53. – P. 482–490.

Список сокращений:

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота,
ПЦР – полимеразная цепная реакция,
DNA – deoxyribonucleic acid,
PCR – polymerase chain reaction,
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт.

EFFECT OF PROBIOTIC PREPARATION BASED ON *BACILLUS SUBTILIS* ON THE RATS INTESTINAL MICROBIAL COMMUNITY

E.V. SKVORTSOV, Rish. S. MUHAMMADIEV, Rin. S. MUHAMMADIEV, L.R. VALIULLIN

Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety – All-Russian Research Veterinary Institute, Kazan

Bacillus subtilis bacteria have been studied for use as a probiotic preparation. When assessing the effectiveness of the use of probiotics, it was assumed that the DNA content of bacteria in feces is proportional to their content in the intestine. Analysis of the amount of bacterial DNA was performed by real-time PCR. We have developed new highly specific primers and fluorescent probes to the gene of *gyrA* (AY663697.1) *B. subtilis*. The method we developed allows us to establish the belonging of bacteria to the species *B. subtilis* and quantify them in feces samples. The use of the drug was reflected in an increase in the amount of *B. subtilis* in the intestine and, as a consequence, their DNA in the feces of rats. An increase in the number of *B. subtilis* bacteria was accompanied by a decrease in the number of *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. and *E. coli* in the intestine. The ability of *B. subtilis* bacteria to exert a positive effect on body weight gain in rats was shown.

Keywords: microbial community, intestines, probiotics, genetic analysis.

ПРОДУКТЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ГЛЮКАНОВЫХ И ХИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫХ СОПОЛИМЕРОВ ИЗ БИОМАССЫ МИКРОМИЦЕТОВ

Н.Ю. ШАРОВА*, Б.С. МАНЖИЕВА

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Санкт-Петербург

В статье представлены данные об исследованиях состава хитин-глюкановых сополимерных комплексов (ХГСК) мицелия штаммов Л-4 и В-3 *Aspergillus niger* — продуцентов кислот, ферментов. Содержание хитина в пересчете на сухие вещества биомассы штамма Л-4 при ферментации меласной среды составило $39 \pm 2\%$, сахарозо-минеральной среды — $43 \pm 1\%$. Для штамма В-3 при ферментации меласной среды показатель находился на уровне $43 \pm 2\%$, сахарозо-минеральной среды — $46 \pm 1\%$. Содержание β -глюкана в биомассе для обоих штаммов находилось на уровне 5–7% при культивировании на меласной среде, 7–9% — на сахарозо-минеральной среде. ХГСК после стадий депротеинизации, деминерализации и последующего перевода хитина в растворимую форму под воздействием кислой среды трансформируются в комплекс, содержащий в основном глюкановый сополимер. Биокатализ глюканового сополимера в присутствии β -глюканазы *Trichoderma longibrachiatum* приводит к его деструкции до моно-, ди- и полисахаридов. Увеличение суммарного содержания моно- и дисахаридов по отношению к полисахаридам в составе гидролизатов наблюдалось при дозировке β -глюканазы от 400 ед./г с.в. и выше. Полученные гидролизаты содержат аминокислоты. Количество аминного азота в составе ХГСК биомассы, полученной при культивировании продуцентов на сахарозо-минеральной среде, выше в 2–3 раза, чем на меласной среде.

Ключевые слова: штаммы *Aspergillus niger*, хитин, глюкан, сополимеры, β -глюканаза, аминокислоты.

Введение

В настоящее время внимание ученых привлекают природные полимеры как экологически безопасные вещества, получаемые из возобновляемых источников. В качестве экономически выгодного источника ряда уникальных полисахаридов представляет интерес мицелиальная масса микромицета *Aspergillus niger* — продуцента пищевых кислот и ферментов. Микромицет *Aspergillus niger* обладает высоким содержанием ХГСК. В отличие от хитина из традиционного сырья (ракообразных), хитин грибов образует комплексы с глюканами, которые тяжело разрушить. Поэтому при кислотнo-щелочной обработке мицелиальной массы грибов получают ХГСК, а не хитин. Способность ХГСК и его производных (хитозан, глюка-

ны, хитозанглюканы) к волокно- и пленкообразованию, ионному обмену, высокая биологическая активность при отсутствии токсичности определяют перспективы использования их в медицине, биотехнологии, пищевой и других отраслях в качестве аналога пищевых волокон, стимулятора роста растений, добавки в хлеб для увеличения продолжительности хранения и замедления черствения, ингредиента в составе пищевых продуктах функционального назначения.

Целью данной работы является исследование действия β -глюканазы на хитин-глюкановый комплекс из отхода производства лимонной кислоты — мицелиальной массы штаммов микромицета *Aspergillus niger*.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась мицелиальная масса штаммов Л-4 и В-3 микромицета *Aspergillus niger*, полученная в лабораторных условиях при ферментации меласной и сахарозо-минеральной сред; длительность культивирования 144 ч [5, 6]. После щелочной обработки мицелиальной массы на стадиях депротеинизации и деминерализации получен образец ХГСК1. В результате

© 2019 г. Шарова Н.Ю., Манжиева Б.С.

* Автор для переписки:

Шарова Наталья Юрьевна

д.т.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии производства пищевых добавок и микроингредиентов ВНИИПД — филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Санкт-Петербург

E-mail: natalya_sharova1@mail.ru

последующей кислотной обработки образца ХГСК1 для перевода хитина в растворимую форму (хитозан) получен образец ХГСК2 [3].

Для ферментативного гидролиза образцов ХГСК1 и ХГСК2 использовали β -глюканазу (эндо-1,3(4)- β -глюканаза) *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich, США; 3100 ед. β ГЛС/г), обладающую специфичностью действия на β -глюканы клеточной стенки мицелиальных грибов. Условия биокатализа: рН=(4,7±0,1) ед.; t=(48±2) °С, дозировка фермента в пределах от 100 до 1800 ед./г сухого вещества (с.в.). После стадии гидролиза β -глюканазу в полученных гидролизатах инактивировали путем термического воздействия и далее гидролизат центрифугировали в течение 20 мин при 20000 г.

В биомассе определяли содержание хитина [2]; в супернатантах гидролизатов — содержание глюкозы, дисахаридов (в пересчете на мальтозу), полисахаридов (в пересчете на декстрины) методом Зихерда — Блейера в модификации Смирнова [7], хитозана — в пересчете на хитозансульфат по методу Музарелли [4], β -глюкана — по методу [1]. В супернатантах гидролизатов и остаточной массе определяли количество аминного азота методом формольного титрования методом [8].

Обработку экспериментальных данных проводили с привлечением методов математической статистики и программ Excel XP.

Результаты и обсуждение

Структурные полисахариды биомассы микромицета *Aspergillus niger* представлены разветвленными глюканами, имеющими β -(1-3)- и β -(1-6)-гликозидные связи, и полиаминосахаридом хитином. Хитин и глюкан соединяются между собой ковалентными связями, придающими устойчивость ХГСК, что делает невозможным выделение компонентов по отдельности друг от друга без разрушения одного из них. Хитин и глюкан являются щелоченерастворимыми, что осложняет их разделение. Согласно литературным данным, для разрушения ХГСК используют биокатализ [9–19].

Результаты проведенных исследований для штаммов Л-4 и В-3 микромицета *Aspergillus niger* с использованием β -глюканазы *Trichoderma longibrachiatum* показали эффективность гидролиза ХГСК1 до производных глюкана и производных хитина после воздействия на его структуру щелочей и кислот (табл. 1 и 2).

Таблица 1

Результаты ферментативного гидролиза образца ХГСК1 (супернатант, мелассная среда)

Дозировка β -глюканазы, ед./г с.в.	Содержание углеводов, г/100 г с.в.			Содержание хитозана в остаточной массе, мг/г с.в.
	глюкоза	дисахариды	полисахариды	
100	6±1	22±1	72±3	15±1
200	9±1	22±2	69±1	26±1
400	10±1	33±2	57±2	35±2
600	10±1	38±2	52±2	74±3
1000	12±1	44±2	44±2	87±3
1200	12±1	48±1	40±2	132±5
1800	14±1	48±1	38±1	130±8

Таблица 2

Результаты ферментативного гидролиза образца ХГСК1 (сахарозоминаральная среда)

Дозировка β -глюканазы, ед./г с.в.	Содержание углеводов, г/100 г с.в.			Содержание хитозана в остаточной массе, мг/г с.в.
	глюкоза	дисахариды	полисахариды	
100	7±1	19±3	74±3	17±3
200	12±1	25±2	63±1	29±1
400	12±1	32±2	56±2	38±2
600	13±1	36±2	51±2	82±5
1000	14±2	43±2	43±2	92±1
1200	13±1	45±1	42±2	152±4
1800	14±1	47±1	39±1	150±4

В супернатантах, полученных после гидролиза ХГСК1 и его центрифугирования, выявлены растворимые формы хитина, то есть хитозан и его производные, растворимые в кислой среде, и углеводы — продукты гидролиза глюкановой цепи под действием эндо-1,3(4)- β -

глюканазы. Суммарное содержание моно- и дисахаридов превышало содержание полисахаридов при дозировке β -глюканазы более 1000 ед./г с.в.

Результаты, полученные для образца ХГСК2, отличались от данных гидролиза для ХГСК1 (табл. 3 и 4).

Таблица 3

Результаты ферментативного гидролиза образца ХГСК2 (супернатант, мелассная среда)

Дозировка β -глюканазы, ед./г с.в.	Содержание углеводов, г/100 г с.в.			Содержание хитозана в остаточной массе, мг/г с.в.
	глюкоза	дисахариды	полисахариды	
100	10±1	31±1	59±3	7±1
200	15±1	35±2	54±2	6±1
400	22±1	60±2	18±2	5±1
600	25±1	58±1	17±1	5±1
1000	21±1	63±1	16±1	6±1
1200	12±1	64±1	24±1	5±1
1800	11±1	64±1	25±1	5±1

Таблица 4

Результаты ферментативного гидролиза образца ХГСК2 (супернатант, сахарозоминаральная среда)

Дозировка β -глюканазы, ед./г с.в.	Содержание углеводов, г/100 г с.в.			Содержание хитозана в остаточной массе, мг/г с.в.
	глюкоза	дисахариды	полисахариды	
100	8±1	31±1	61±3	7±1
200	10±1	35±2	55±2	7±1
400	10±1	43±2	47±2	7±1
600	10±1	49±2	41±3	6±1
1000	15±1	51±2	37±3	7±1
1200	15±1	50±1	35±2	8±1
1800	14±1	52±1	34±1	8±1

Содержание хитозана было на 1–2 порядка выше, чем в супернатантах гидролизатов ХГСК1. Увеличение суммарного содержания моно- и дисахаридов по отношению к полисахаридам наблюдалось при дозировке β -глюканазы от 400 ед./г с.в. и выше. По-видимому, после последующей кислотной обработки образца ХГСК1 для перевода хитина в хитозан увеличивается доступность глюкановой цепи для ферментативной атаки субстрата β -глюканазой, обладающей специфичностью действия на β -(1-3)- и β -(1-6)-гликозидные связи, характерные для ХГСК клеточной стенки микроорганизма *Aspergillus niger*.

Наличие аминокрупп в супернатантах после гидролиза образцов ХГСК2, возможно, обусловлено следовыми количествами хитозана и/или аминокислот, которые являются результатом действия протеазы,

присутствующей в препарате β -глюканазы *Trichoderma longibrachiatum* (рис. 1, 2). Белковые вещества можно исключить, так как при термической инактивации β -глюканазы после реакции гидролиза белок денатурировал.

В сравнительном аспекте в супернатантах гидролизатов ХГСК1 выявленное количество аминного азота в 2,7–3 раза больше при культивировании продуцента на сахарозоминаральной среде. По-видимому, это обусловлено особенностями структуры полиаминосахаридов ХГСК биомассы и более высокой их растворимостью в кислой среде при ферментативном гидролизе. Аминосоединения в супернатантах гидролизатов ХГСК2 при ферментации как сахарозоминаральной, так и мелассной среды найдены в меньшем количестве. Массовая доля их в обоих случаях находилась на уровне 5–7%.

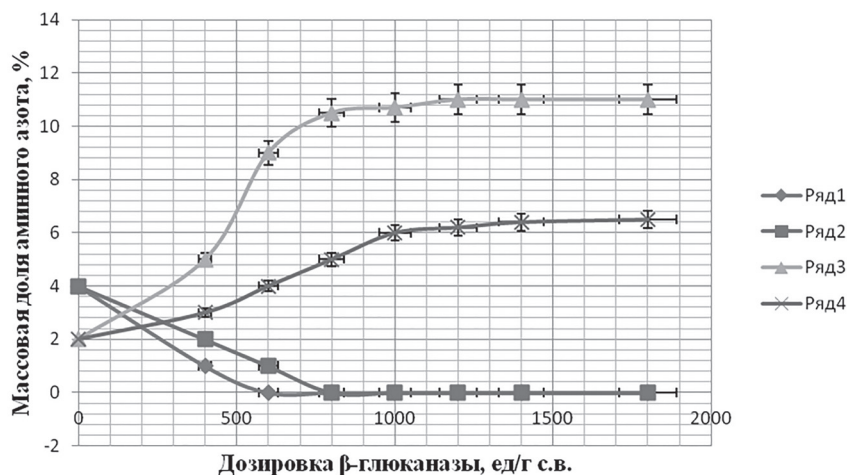


Рис. 1. Динамика количества аминокислот в супернатантах после ферментативного гидролиза ХГСК1 и ХГСК2; мелассная среда. Условные обозначения: ряды 1 и 3 – действие на ХГСК1; ряды 2 и 4 – действие на ХГСК2; \blacklozenge , \blacktriangle – остаточная масса; \blacksquare , \times – супернатант

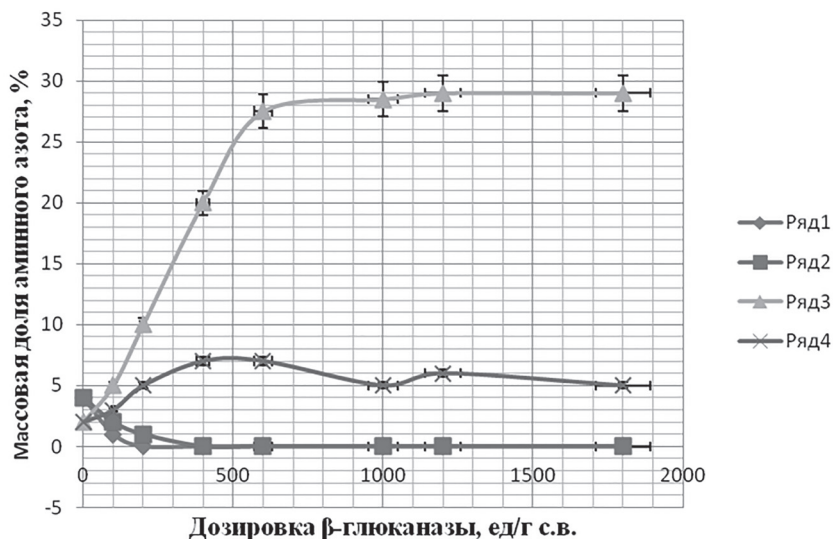


Рис. 2. Динамика количества аминокислот в супернатантах после ферментативного гидролиза ХГСК1 и ХГСК2; сахарозо-минеральная среда. Условные обозначения: ряды 1 и 3 – действие на ХГСК1; ряды 2 и 4 – действие на ХГСК2; \blacklozenge , \blacktriangle – остаточная масса; \blacksquare , \times – супернатант

Результаты исследований показали незначительные отличия в количественном содержании хитина, глюканов и их производных в биомассе штаммов Л-4 и В-3 при культивировании на углеводсодержащих средах. Содержание хитина в пересчете на сухие вещества биомассы штамма Л-4 при ферментации мелассной среды составило от 37 до 41%, для штамма В-3 – от 41 до 45%. При культивировании на сахарозо-минеральной среде для штамма Л-4 показатель находился в пределах от 42 до 44%, для В-3 – от 45 до 47%. Количество β -глюкана в биомассе для обоих штаммов было значительно меньше и варьировало от 5 до 7 % при культивировании на

мелассной среде, от 7 до 9 % – на сахарозо-минеральной среде. Для штамма Л-4 известна информация о соотношении хитиновой и глюкановой составляющих в ХГСК биомассы, полученной в производственных условиях при ферментации мелассной среды: 81,6% хитина и 15,1% глюкана [4]. Для лабораторного образца биомассы, полученной при культивировании штамма Л-4 на сахарозо-минеральной среде, значения составили соответственно 97,0 и 2,3% [4].

На основании полученных данных сделан вывод о том, что исследуемые образцы мицелиальной массы микроциета *Aspergillus niger* после стадий депротеи-

низации и деминерализации, а также после кислотной обработки при последующем действии β -глюканазы деформируются до низкомолекулярных углеводов. Полученные гидролизаты ХГСК содержат аминокислоты, которые могут обладать сорбционной способностью. Глюканы с различной молекулярной массой представляют интерес в качестве ингредиентов для пищевых продуктов функционального назначения.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительном потенциале микробной массы аспергиллов. В качестве отхода промышленного производства исследуемая биомасса является перспективным источником важных пищевых микроингредиентов, производство которых в РФ отсутствует или развивается: среди них технологии пищевых волокон. Химическая структура волокон микробного происхождения представлена в основном функционально активными формами. Хитозан обладает высокой сорбционной способностью, а глюкановая составляющая содержит β -1,3/1,6-связи, благодаря которым β -глюканосодержащие ингредиенты и их производные (мальтодекстрины) целенаправленно используются и востребованы в качестве пищевых добавок при изготовлении широкого ассортимента продуктов. Исследования следует продолжить в направлении выбора способа выделения продуктов ферментативного гидролиза и их корректной идентификации.

Литература

- ГОСТ Р 57513-2017. Продукция пищевая специализированная. Методы определения (β -глюканов). — М.: Стандартинформ, 2017. Дата введения 2018—07—01.
- Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. — Киев: Наук. думка, 1982. — 192 с.
- Новинюк Л.В., Кулёв Д.Х., Велизон П.Э., Шарова Н.Ю. Выделение хитин и хитозанглюкановых биополимеров из мицелиальных отходов производства лимонной кислоты // Пищевая промышленность. — 2016. — № 11. — С. 30—31.
- Осовская И.И., Будилина Д.Л., Тарабукина Е.Б., Нудьга Л.А. Хитин-глюкановые комплексы (физико-химические свойства и молекулярные характеристики): учебное пособие. Под ред. Г.М. Полторацкого. ГОУ ВПО СПбГТУРП. — СПб., 2010. — 52 с.
- Патент 975799 СССР, МКИ С 12 N 15/00, С 12 Р 7/48. Штамм гриба *Aspergillus niger* Л-4 — продуцент лимонной кислоты / Ермакова В.П., Финько В.М., Василинец И.М., Щербакоева Е.Я., Шушкевич Т.И.; заявитель и патентообладатель: Ленинградский меж-
- отраслевой научно-исследовательский ин-т пищевой промышленности — № 2955606/28-23; заявл. 13.06.80; опубл. 25.11.82. Бюл. № 43.
- Патент 2088658 Российская Федерация, МПК6 С 12 1/14, С 12 Р 7/48 (С 12 1/14, С 12 1/35). Штамм гриба *Aspergillus niger* — продуцент лимонной кислоты / Красикова Н.В., Никифорова Т.А., Галкин А.В., Финько В.М.; заявитель и патентообладатель: Санкт-Петербургский научно-исследовательский ин-т пищевых ароматизаторов, кислот и красителей — № 95116715; заявл. 27.09.95; опубл. 27.08.97.
- Трегубов Н.Н., Костенко В.Г. Технологический контроль крахмалопаточного производства. — М.: Агропромиздат, 1992. — 271 с.
- Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины: Учеб. пособие. — СПб.: Университет ИТМО, 2015. — 106 с.
- Duenas-Santero E., Martin-Cuadrado A.B., Fontaine T., Latge J.P., del Rey F., Vazquez de Aldana C. Characterization of glycoside hydrolase family 5 proteins in *Shizocaccharomyces pombe* // Eukaryot. Cell. — 2010. — Vol. 9(11). — P. 1650—1660.
- Fuglsang C.C., Berka R.M., Wahleithner J.A., Kauppinen S., Shuster J.R., Rasmussen G., Halkier T., Dalboge H., Henrissat B. Biochemical analysis of recombinant fungal mutanases. A new family of β -1,3-glucanases with novel carbohydrate-binding domains // J. Biol. Chem. — 2000. — Vol. 275(3). — P. 2009—2018.
- Hamid R., Khan M.A., Ahmad M., Ahmad M.M., Abdin M.Z., Musarrat J., Javed S. Chitinases: An update // J. Pharm. Bioallied Sci. — 2013. — Vol. 5(1). — P. 21—29.
- Heggset E.B., Dybvik A.I., Hoell I.A., Norberg A.L., Sørli M., Eijsink V.G., Vårum K.M. Degradation of chitosans with a family 46 chitinase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Biomacromolecules. — 2010. — Vol. 11(9). — P. 2487—2497.
- Manni L., Ghorbel-Bellaaj O., Jellouli K., Younes I., Nasri M. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1 // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2010. — Vol. 162(2). — P. 345—357.
- Mukhin V.A., Novikov V.Y. Enzymatic hydrolysis of proteins from crustaceans of the Barents Sea // Appl. Biochem. Micro. — 2001. — Vol. 37(5). — P. 538—542.
- Nwe N., Furuike T., Tamura H. Production, properties and applications of fungal cell wall polysaccharides: Chitosan and glucan // Advances in Polymer Science. — 2011. — Vol. 244(1). — P. 187—207.
- Nwe N., Stevens W.F., Tocura S., Tamura H. Characterization of chitosan and chitosan-glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by

- enzymatic method // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2008. – Vol. 42(3). – P. 242–251.
17. Stalhberger T., Simenel C., Clavaud C., Eijsink V.G., Jourdain R., Delepierre M., Latge J.-P., Breton L., Fontaine T. Chemical organization of the cell wall polysaccharide core of *Malassezia restricta* // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289(18). – P. 12647–12656.
18. Younes I. and Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // *Marine Drugs*. – 2015. – Vol. 13(3). – P. 1133–1174.
19. Younes I., Ghorbel-Bellaaj O., Nasri R., Chaabouni M., Rinaudo M., Nasri M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization // *Process Biochem*. – 2012. – Vol. 47(12). – P. 2032–2039.

PRODUCTS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF GLUCAN AND CHITIN CHAINS OF CHITIN-GLUCAN COPOLYMERS FROM MICROMYCETES BIOMASS

N.Yu. SHAROVA, B.S. MANZHIEVA

*All-Russian Research Institute of Food Additives –
a branch of the V.M. Gorbatov Federal Research Center of Food Systems RAS, St. Petersburg*

The article presents data on studies of the composition of chitin-glucan copolymer complexes (CGC) of the mycelium of strains L-4 and B-3 *Aspergillus niger* – producers of acids and enzymes. The chitin content in terms of dry matter of the biomass of strain L-4 during the fermentation of molasses medium was $39\pm 2\%$, during fermentation sucrose-mineral medium was $43\pm 1\%$. For strain B-3, during the fermentation of molasses medium, the indicator was at the level of $43\pm 2\%$, and of the sugar mineral medium, at $46\pm 1\%$. The content of β -glucan in biomass for both strains was at the level of 5–7% when cultivated on a molasses medium, 7–9% – on a sucrose-mineral medium. CGC after the stages of deproteinization, demineralization and subsequent conversion of chitin into a soluble form under the influence of an acidic medium are transformed into a complex containing mainly a glucan copolymer. The biocatalysis of the glucan copolymer in the presence of *Trichoderma longibrachiatum* β -glucanase leads to its destruction to mono-, di- and polysaccharides. An increase in the total content of mono- and disaccharides with respect to polysaccharides in the composition of hydrolysates was observed at the dosage of β -glucanase from 400 units/g dw. and higher. The resulting hydrolysates contain amino compounds. The amount of amine nitrogen in the composition of CGC biomass, obtained by cultivating the producers on the sugar mineral medium, is 2–3 times higher than on the molasses medium.

Keywords: *Aspergillus niger* strains, chitin, glucan, copolymers, β -glucanase, amino compounds.

ТУЛЯРЕМИЙНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

А.О. КОЧЕТКОВА*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, Н.В. ПАВЛОВИЧ, М.П. ПОГОЖОВА

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

В обзоре представлены современные сведения по проблеме использования туляремийных бактериофагов. Подчеркивается возобновление интереса к бактериофагам в связи с нарастанием антибиотикорезистентности микроорганизмов. Дана краткая информация о патогенности возбудителя туляремии. Рассмотрены различные разновидности туляремийных бактериофагов, которые не могут быть использованы для идентификации и лечения туляремии. Тем не менее считается, что поиск перспективных в данном контексте туляремийных бактериофагов представляет собой актуальную задачу.

Ключевые слова: туляремийные бактериофаги, диагностика и лечение туляремии.

В настоящее время исследование бактериофагов испытывает своего рода второе рождение благодаря новой оценке важности и степени присутствия их в природе, а также благодаря значительному общественному и научному интересу к фагам как к агентам против антибиотикорезистентных патогенных микробов. Еще до открытия и широкого использования антибиотиков Ф. д'Эреллем были предложены бактериофаги, которые исследовались и использовались в различных странах как эффективные средства борьбы с бактериальными инфекциями [1, 11]. Сейчас, когда недостатки антибиотиков стали очевидны, интерес к бактериофагам возобновился [24]. Развитие резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам уже достигло глобальных масштабов [18]. Туляремийный микроб обладает природной устойчивостью к бета-лактамам (пеницилинам и цефалоспорином), макролидам (полимиксину и линдомцину), является трудно диагностируемым, и поэтому актуален поиск эффективных и альтернативных схем лечения и диагностики туляремии.

Туляремия — особо опасная инфекция, являющаяся природно-очаговым зоонозом, с различными клиническими формами заболевания:

- с поражением внутренних органов: легочная, бронхопневмоническая, печеночная и др.;

- генерализованная форма;
- с поражением кожи, слизистых оболочек и лимфатических узлов: бубонная, язвенно-бубонная, ангинозно-бубонная, глазобубонная [22].

Возбудитель туляремии — внутриклеточный паразит, способный инфицировать макрофаги, выживать в таких клетках, как гепатоциты, фибробласты, клетки эндотелия и эпителия, а также персистировать в простейших. Бактерии *Francisella tularensis* — одни из немногих патогенов, которые могут выживать в нейтрофилах [14, 17, 19, 36]. Отличительная особенность возбудителя — множественность путей (механизмов) передачи инфекции при практически 100%-ной восприимчивости человека без различия пола и возраста и отсутствие передачи его от человека человеку. Основные резервуары возбудителя в природе — это грызуны, среди которых в естественных условиях наблюдаются эпизоотии. *F. tularensis* — один из наиболее вирулентных микроорганизмов, заражающая доза которого при аэрогенном заражении составляет 10 микробных клеток [8, 9]. Из-за высокой вирулентности туляремийный микроб рассматривается как наиболее вероятное средство биотерроризма [13, 20, 33]. Реальная возможность применения противником биологического оружия в вооруженных конфликтах, в войнах или при террористических актах является серьезной проблемой для любой страны [22].

В наши дни заболевание туляремией регистрируется во всем Северном полушарии с очагами в центральных районах Северной Америки, Европы и Северной Азии. Недавно впервые было описано выделение близкородственных представителей рода — *F. novicida* в Южном полушарии — в Австралии — из гнойного отделяемого

© 2019 г. Кочеткова А.О., Гаевская Н.Е., Павлович Н.В., Погожова М.П.

* Автор для переписки:

Кочеткова Анна Олеговна
младший научный сотрудник, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
E-mail: Kochetkova_AO@antiplague.ru

раны человека. Вспышки заболевания ежегодно отмечаются в США, Германии, Франции, Чехии, Австрии, Испании, после 60-летнего спокойного периода — в Турции [22]. На территории Российской Федерации в центральных и северо-западных областях эпизоотическая активность туляремии подтверждается обнаружением значительного числа положительных на туляремию проб из объектов внешней среды [21, 23]. В Европе каждый год регистрируют около 1200 случаев туляремии, то есть уровень заболевания достаточно низкий, однако стабильное и длительное сохранение очагов и появление вспышек инфекции у людей требует мониторинга эпидемиологической ситуации. Наиболее интенсивно эти работы ведутся в Швеции и в последние годы в Турции [32, 33, 38]. В пользу этого свидетельствует регистрируемая заболеваемость [2, 6], характерной особенностью которой в основном является то, что более 70% заболевших составляют невакцинированные против туляремии городские жители. Это объясняется повышенным интересом к работе на земельных участках и интенсификацией «дикого» туризма.

Доказательством служат положительные результаты серологических и кожных аллергических проб на туляремию без установленного диагноза в анамнезе. То есть данное заболевание может иметь благополучное течение и проявляться в виде легких случаев ангины, бронхита, гнойной раны, лимфаденита [25]. Широкая распространенность туляремии в природе [28], высокая инфекционность, возможность аэрозолирования и легкость распространения возбудителя во внешней среде [34] обуславливают необходимость вакцинации населения в эндемичных районах и в группах риска. В текущий момент эффективную защиту против туляремии обеспечивает только живая вакцина.

Напряженная эпидемическая обстановка, сложившаяся в последнее время по ряду инфекционных заболеваний, включая туляремию, и неблагоприятный прогноз ее развития на ближайшие годы диктуют необходимость совершенствования средств их диагностики [2, 4, 6, 7].

Ведущие диагностические методы туляремии у человека — это иммунологические методы. Наиболее ранняя диагностика (в течение первой недели заболевания) возможна с помощью ИФА (иммуноферментный анализ) [3, 13, 16, 27]. В то же время для подтверждения заболевания необходимым этапом является исследование парной сыворотки больного с обязательной регистрацией нарастания титра специфических противотуляремийных антител. Забор парной сыворотки обычно проводят на 10–14-й день после начала болезни, что весьма удлиняет

срок диагностики. Все большее значение при идентификации и дифференциации возбудителей инфекционных заболеваний приобретают молекулярно-биологические подходы, базирующиеся на анализе генома микроорганизмов. Ныне ПЦР-анализ уже прочно вошел в практику эпизоотологического исследования на туляремию и применяется как при обследовании биотических, так и абиотических объектов внешней среды. Более того, разработаны наборы праймеров, позволяющие проводить не только определение вида возбудителя, но и его подвиговую принадлежность. Недостатком этого метода является одновременная амплификация ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма.

Самый эффективный метод — это биологический. Его чувствительность составляет всего 1 микробную клетку для высоковосприимчивых лабораторных животных — белых мышей и морских свинок [22]. Биопробных животных заражают и выдерживают: белых мышей — до 15–21 суток, морских свинок — до 25 суток [15]. Но, как известно, золотым стандартом диагностики заболевания бактериальной природы является выделение чистой культуры, поскольку только выделение культуры *F. tularensis* служит бесспорным доказательством заболевания. Все остальные методы, будь то иммунологические, молекулярно-генетические, пригодны лишь для постановки предварительного или ретроспективного диагноза [27].

Один из перспективных методов при идентификации возбудителя — это использование специфических бактериофагов. Например, в схеме лабораторной диагностики большинства особо опасных заболеваний бактериальной природы (чума, холера и др.) используются специфические бактериофаги, позволяющие в короткие сроки и с высокой степенью достоверности идентифицировать микробную культуру [5, 12]. Кроме того, высокая специфичность бактериофагов дает возможность эффективно применять их не только для диагностических, но и лечебных целей [37].

В ходе многолетнего поиска удалось выделить туляремийный бактериофаг и разработать способ его получения. Такой умеренный бактериофаг туляремии был изолирован группой ученых из органов морской свинки, зараженной живой культурой туляремийного вакцинного штамма № 15, линии НИИЭГ, и депонирован в коллекции фагов ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» под обозначением ГАЛ. Обнаруженный неизвестный ранее бактериофаг характеризуется активностью в отношении всех подвигов возбудителя туляремии, обладает способностью к адсорбции на поверхности франциселл и вызывает их лизис, обусловленный репродукцией

фаговых частиц в инфицированной бактериальной клетке. Изучение ультраструктуры туляремийного фага показало, что он относится к первой морфологической группе вирусов бактерий по классификации А.С. Тихоненко [26] и к группе *F. inoviridae* по классификации Ackermann H.W. [30]. По результатам электронной микроскопии, бактериофаг представляет собой корпускулы нитевидной формы толщиной до 20 нм и длиной до 400 нм, тип нуклеиновой кислоты — ДНК. Он термоллабилен. Инактивация начинается при температуре 50 °С, а полное разрушение происходит после инкубации при температуре 55 °С в течение 30 мин. Бактериофаг лизирует бактерии возбудителя туляремии трех подвигов (среднеазиатского, неарктического и голарктического), а также основных видов возбудителей болезни легионеров (*Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*) [4].

Еще один туляремийный умеренный бактериофаг был выделен в 2010 году группой американских ученых путем индуцирования митомицином С. Его обозначили ASC10 по первым трем буквам имен исследователей. Фаг ASC10 обладает икосаэдрической головкой приблизительно 114 нм в диаметре и несокращающимся хвостом длиной 92 нм. Данный бактериофаг является членом семейства *Siphoviridae*. Он образует зоны лизиса на разных штаммах *Francisella*, включая *F. tularensis* subsp. *Tularensis* штамм MA00-2987, *F. tularensis holarctica* штамм K499-3387, *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4 и *F. tularensis* subsp. *holarctica* штамм LVS, *F. tularensis novicida* U112, *F. philomiragia* [29]. Выделенные бактериофаги умеренные и не являются строго специфичными.

В Грузии для выделения специфических туляремийных бактериофагов использовали метод обогащения. Обогащение проводили в бульоне ВНИ (агар сердечно-мозговой) с добавлением 0,1% цистеина, 1% глюкозы и смеси антибиотиков. Бактериофаги выделяли из клещевых проб (в количестве 8 проб, положительных по ПЦР-тестированию), собранных в регионе Картли в 2014 году, образцы из окружающей среды, вакцины (Ft-LVS) и четырех вирулентных штаммов (Ft-4809, Ft-4812, Ft-6958 и Ft-8932). На плотной питательной среде СНАВ зоны лизиса образовывали три пробы от клещей и один образец из окружающей среды, тогда как литическая активность в жидкой среде (ВНИ) была обнаружена в шести образцах. Для повышения литической активности фагов использовался метод Аппельмана. Электронно-микроскопическое исследование фаговых лизатов выявило частицы фага различной морфологии, представляющие два семейства: *Siphoviridae* и *Myoviridae*. Полученные

фаги не стабильны, хоть и имеют высокую активность против бактерий-хозяев в жидких средах [31].

На основании вышеперечисленных свойств данные туляремийные бактериофаги не могут быть использованы для идентификации и лечения туляремии. Поиск новых туляремийных высоковирулентных и строго специфичных бактериофагов с широким спектром литической активности в перспективе может внести значительный вклад в создание безопасных терапевтических и диагностических фаговых препаратов.

Основная проблема, связанная с безопасностью фаговой терапии, — проверка того, что лечебный фаговый коктейль содержит исключительно вирулентные фаги и не содержит лизогенных, так как некоторые лизогенные (умеренные) фаги могут переносить опасные бактериальные гены от одного хозяина к другому. Исследования показали, что когда фаговые препараты тщательно подобраны, они могут быть сопоставимы по эффективности или превосходить антибиотики в лечении инфекций у людей.

С другой стороны, исследования, в которых фаги и антибиотики применялись одновременно, показали, что комбинированное использование фагов и антибиотиков улучшает результат терапии. Совместное применение фагов и антибиотиков может помочь избежать проблем, связанных с появлением антибиотикоустойчивых и фагоустойчивых бактериальных мутантов [10, 11].

В этой связи нам представляются целесообразными поиск и изучение специфических туляремийных бактериофагов в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Здесь собрана большая коллекция штаммов *F. tularensis*, что позволит нам провести поиск туляремийных бактериофагов, перспективных для диагностики и лечения туляремии.

Литература

1. Алешкин А.В., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Галимзянов Х.М., Рубальский О.В., Теплый Д.Л., Ахминева А.Х., Киселева И.А., Бочкарева С.С., Рубальская Е.Е., Рубальский Е.О., Смирнова К.Н., Зулькарнеев Э.Р., Теплый А.Д. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть 1: история исследований до широкого применения антибиотиков // Астраханский мед. журн. — 2016. — Т. 11. — № 2. — С. 8–16.
2. Балахонов С.В., Косилко С.А., Бренева Н.В., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Климов В.Т., Никитин А.Я., Сидорова Е.А., Севостьянова А.В., Трушина Ю.Н., Мельникова О.В., Ярыгина М.Б., Худченко С.Э., Чеснокова М.В., Андаев Е.И. Эпидемиологическая

- ситуация по природноочаговым инфекционным болезням бактериальной и вирусной этиологии в 2012 г. в Сибири и на Дальнем Востоке и прогноз ее развития на 2013 г. // Пробл. особо опас. инф. — 2013. — № 1. — С. 38–43.
3. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний // Клин. лаб. диагностика. — 1998. — № 2. — С. 35–39.
 4. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году». — URL: http://www.gospotrebnadzor.ru/gd_2013_dlyasayta.pdf.
 5. Григорьев А.А., Разгулин С.А., Бондарев В.П., Борисевич И.В. Туляремийный бактериофаг: выделение и основные биологические свойства // Медицин. альманах. — 2011. — Вып. 5. — № 18. — С. 198–201.
 6. Демидова Т.Н., Попов В.П., Полухина А.Н., Орлов Д.С., Мещерякова И.С. Современная эпидемиологическая ситуация туляремии в Северо-Западном Федеральном округе России // Эпидемиол. и вакцинопрофилакт. — 2016. — Вып. 5. — № 90. — С. 14–23.
 7. Демидова Т.Н., Попов В.П., Полухина А.Н., Орлов Д.С., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В. Эпизоотическое и эпидемическое проявление природных очагов туляремии на территории Московской области (1965–2013 гг.) // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2015. — № 2. — С. 24–31.
 8. Домарадский И.В. Проблемы патогенности франциселл и пути их решения // Микробиол. — 2005. — № 1. — С. 106–110.
 9. Емельянова О.С. Некоторые вопросы микробиологии туляремии // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 1946. — № 11. — С. 10–16.
 10. Захаренко С.М. Бактериофаги: современные аспекты применения, перспективы на будущее // Мед. совет. — 2013. — № 10. — С. 72–75.
 11. Каттер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: Биология и практическое применение: Пер. с англ. — М.: Научный мир, 2012. — 640 с.
 12. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / Под ред. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. — М.: Шико, 2013. — 555 с.
 13. Мелиниченко П.И., Шумилов В.И., Карниз А.Ф. Совершенствование индикации возбудителей опасных инфекций в условиях локальных войн и вооруженных конфликтов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2000. — № 2. — С. 3–6.
 14. Мишанькин Б.Н., Павлович Н.В., Романова Л.В. Туляремия // Лаб. диагност. возбудит. особо опасн. инф. болезней. — 1998. — № 1 — С. 111–143.
 15. МУ 1.3.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией». — М., 2005. — С.104–142.
 16. МУ 3.1.2007-05 «Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией». — М., 2005. — 59 с.
 17. Никифоров В.В., Кареткина Г.Н. Туляремия: от открытия до наших дней // Инфекц. болезни. — 2007. — Т. 5. — № 1. — С. 67–76.
 18. Неклюдов Н.А., Чепелова Н.К. Антибиотикорезистентность у бактерий: поиск инновационных путей преодоления // World science: problems and innovations. — 2018. — С. 287–289.
 19. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. — М.: Медицина, 1975. — 192 с.
 20. Онищенко Г.Г. Инфекционные болезни важнейший фактор биоопасности // Эпидемиол. и инф. болезни. — 2003. — № 3. — С. 4–16.
 21. Попов В.П., Орлов Д.С., Безсмертный В.Е. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка в 333 природных очагах туляремии на территории Центрального Федерального округа Российской Федерации в 1992–2011 гг. // Пробл. особо опасн. инф. — 2012. — Вып. 114. — С. 10–14.
 22. Романова Л.В. *Francisella tularensis*: некоторые аспекты экологии и диагностики: дис. ... д-ра биол. наук. — Ростов-на-Дону, 2008. — 298 с.
 23. Сосницкий В.И., Бузинов Р.В. Туляремия на севере европейской части России. Эпидемиологические особенности туляремии в Архангельской области // Здоровье населен. и среда обитан. — 2003. — Вып. 12. — № 129. — С. 27–31.
 24. Суворов А.Н. Гонки с микробами: наши шансы // Природа. — 2011. — № 5. — С.13–24.
 25. Титова Л.В., Самодова О.В., Кригер Е.А., Гордиенко Т.А., Круглова Н.В., Щепина И.В., Гонтова Ю.В. Туляремия в Архангельской области: клинико-эпидемиологическая характеристика // Инфектолог. — 2016. — Вып. 2. — № 78. — С. 84.
 26. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. — М.: Наука, 1968. — 89 с.
 27. Чумаков М.Э., Шафеев М.Ш., Зорина Л.М., Хасанова И.К., Хакимов Н.М., Лоскутова А.Г., Галимова Г.Х. Туляремия. Эпидемиология и профилактика. — Казань: КГМУ, 2003. — 47 с.
 28. Шеенков Н.В., Опочинский Э.Ф., Вальшев А.В., Вальшева И.В., Карташова О.Л., Паришина А.В. Факторы персистенции *Francisella tularensis* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2006. — № 1. — С. 63–68.
 29. Abeer M.A. Isolation and characterization of a novel bacteriophage, asc10, that lyses *Francisella tularensis*: dissertation for the degree of doctor of philosophy. — Colorado, 2014. — 112 p.

30. *Ackermann H.W.* Bacteriophage taxonomy in 1987 // *Microbiol. Sci.* – 1987. – Vol. 4. – No. 7. – P. 214–218.
31. Bacteriophages against *Francisella tularensis*. – URL: http://www.liv.ac.uk/~hallison/EMBOVoM2016/data/abstracts/abstract_2013.html.
32. *Christenson B.* An outbreak of tularemia in the northern part of central Sweden // *Scand. J. Infect. Dis.* – 1984. – Vol. 16. – No. 3 – P. 285–290.
33. *Cronquist S.D.* Tularemia: the diseases and weapon // *Dermatol. Clin.* – 2004. – Vol. 22. – No. 3. – P. 313–320.
34. *Dworzanski J.P., Deshpande S.V., Chen R., Jabbour R.E., Snyder A.P., Wick C.H., Li L.* Mass spectrometry based proteomics combined with bioinformatic tools for bacterial classification // *J. Proteome Res.* – 2006. – Vol. 5(1). – P. 76–87.
35. *Eliasson H., Beck E.* Tularemia in an emergent area in Sweden: an analysis of 234 cases in five years // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 39. – P. 880–889.
36. *McCaffrey R.L., Allen L.A.* *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape // *Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 80. – P. 1224–1230.
37. *Meador E., Mayer M.J., Steverding D., Carding S.R., Narbad A.* Evaluation of bacteriophage therapy to control *Clostridium difficile* and toxin production in vitro human colon model system // *Anaerobe.* – 2013. – Vol. 22. – P. 25–30.
38. *Tezer H., Ozkaya-Parlakay A., Aykan H.* Tularemia in children, Turkey, September 2009 – November 2012 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 21. – No. 1. – P. 1–7.

TULAREMIA BACTERIOPHAGES AND PROSPECTS FOR THEIR USE

A.O. KOCHETKOVA, N.E. GAEVSKAYA, N.V. PAVLOVICH, M.P. POGOZHOVA

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

The review presents current information on the problem of using tularemia bacteriophages. The resumption of interest in bacteriophages in connection with the growth of antibiotic resistance of microorganisms is emphasised. A brief information on the pathogenicity of the causative agent of tularemia is given. Various types of tularemia bacteriophages that cannot be used for the identification and treatment of tularemia are considered. Nevertheless, it is believed that the search for promising tularemia bacteriophages in this context is an urgent task.

Keywords: tularemia bacteriophages, diagnosis and treatment of tularemia.

ПРИМЕНЕНИЕ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ

П.С. ЕРОХИН*, С.В. ГЕНЕРАЛОВ, Д.В. УТКИН, О.С. КУЗНЕЦОВ,
Е.Г. АБРАМОВА, Н.А. ОСИНА

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

В обзоре приведены основные сведения о применении атомно-силовой микроскопии в исследованиях клеток эукариот. Методы атомно-силовой микроскопии нашли использование в изучении ультраструктуры и морфологических особенностей клеток эукариот, их механических свойств и др. Обсуждены перспективы развития методов атомно-силовой микроскопии в качестве инструмента изучения клеток перевиваемых линий.

Ключевые слова: эукариоты, перевиваемые линии, методы атомно-силовой микроскопии, полуконтактный метод, контактный режим.

Введение

Одним из современных методов изучения мало-размерных систем биологической и небиологической природы является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [2, 4–6, 8, 12, 24, 42].

АСМ позволяет проводить исследования в различных режимах сканирования: прерывистого, непрерывного и бесконтактного, а также получать сведения об электрической и магнитной проводимости объекта исследования [9, 25, 28, 33, 44].

Методы атомно-силовой микроскопии были успешно использованы не только для характеристики поверхности и силовых характеристик твердых тел, но и ДНК, вирусов, клеток про- и эукариот, а также целых органов и тканей [7, 15, 39].

Наиболее активно развивающимися направлениями использования АСМ в изучении биологических объектов являются таковые, связанные с методическими подходами к исследованию возбудителей инфекционных болезней, выявлению и характеристике специфических эпителиев, а также их оценке в условиях неблагоприятного действия факторов окружающей среды [4], в том числе при воздействии бактериофагов и антибактериальных препаратов. Определенный интерес в иммунодиагностике

вызывает применение методов АСМ для определения специфического взаимодействия антиген-антитело [35], лиганда с рецептором [17].

Для отдельных органов и тканей предложено использовать крио-АСМ, подразумевающую изготовление сколов из исходного материала, а также заливки в смолы с последующим травлением ферментами [14]. Дополнительные этапы подготовки материала для исследования иногда существенно удлиняют время эксперимента, что приводит к снижению диагностической эффективности метода.

В настоящем обзоре представлены наиболее характерные примеры использования методов АСМ в изучении клеток эукариот.

1. Режим прерывистого контакта

Режим прерывистого контакта АСМ используется для исследования процессов прикрепления и открепления клеток эукариот к различным поверхностям [9, 26]. Для этих целей применяют подложки из слюды, стекла или пирографита [6]. Согласно данным литературы, а также собственным исследованиям, наиболее объективное описание физических свойств подложки и клеточной стенки [32–34] представляет средняя арифметическая и среднеквадратичная шероховатость [9, 11, 18]. Эта характеристика позволяет оценить состояние не только поверхности клеточной стенки, но и в течение 30–60 мин зарегистрировать отдельные этапы процесса взаимодействия макро- и микроорганизма при так называемой «АСМ с временным разрешением». Подобное обстоятельство является существенным преимуществом при разработке методов диагностики инфекционных болезней и контроля профилактических препаратов.

© 2019 г. Ерохин П.С., Генералов С.В., Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Абрамова Е.Г., Осина Н.А.

* **Автор для переписки:**

Ерохин Павел Сергеевич

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

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Математическое описание шероховатости клеточной стенки представлено следующей формулой [40]:

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |f(x)| dx, \quad (1)$$

где $f(x)$ — кривая шероховатости, соответствующая центральной линии, L — длина кривой шероховатости.

Параметр шероховатости был применен при описании взаимодействия вируса бешенства с перевиваемыми клетками млекопитающих Vero и ВНК [9]. Исследования показали, что шероховатость может быть использована в качестве дифференциального критерия оценки состояния клеток на отдельных этапах культивирования вируса. Отмечена зависимость изменения шероховатости от разведения вируса бешенства и от времени его культивирования. Аналогичные результаты получены и в других исследованиях. Так, на модели клеток ВНК-21 [32] показано, что минимальное время, необходимое для учета результата взаимодействия вируса SFV (Semliki Forest virus) с исследуемыми клетками, составляет 30 мин. При этом отмечали увеличение средней арифметической шероховатости (R_a) в зависимости от времени воздействия в 1,25 раза в течение 4 ч взаимодействия. В то же время влияние вируса TMEV оказывало менее выраженное действие (увеличение показателя составляло 1,15 раза).

Полуконтактный метод АСМ [36] был успешно применен при анализе апоптоза нейтрофилов человека в ходе взаимодействия с липополисахаридом (ЛПС) в режиме реального времени. Установлено увеличение объема и высоты нейтрофилов в 1,45 раза спустя 83 мин взаимодействия по сравнению с контрольными показателями, что может быть использовано в качестве второстепенного критерия оценки морфофункционального состояния клеток эукариот и, в частности, клеточных линий. Вне зависимости от времени проведения эксперимента отмечалась гетерогенность популяции нейтрофилов.

2. Контактная АСМ

Общеизвестно, что жесткость и адгезивность являются фундаментальными свойствами большинства живых клеток [10, 22, 23, 30, 33]. Они определяют сохранность клетки в различных условиях существования.

Изменение морфологии и эластичных свойств эукариот служит основой их персистенции по отношению к внешнему воздействию [37].

Для описания характера взаимодействия зонда с объектом исследования предложено использовать модель Герца [27, 29, 45]. Для клеток эукариот обычно применяется модель Герца контактной геометрии в предположении

аксиальной симметрии. Величина приложенной к клетке силы зависит от глубины проникновения зонда в нее и определяется соотношением:

$$F = \frac{2E(\tan \Theta)h^2}{\pi(1-\nu^2)}, \quad (2)$$

где F — приложенная сила, E — модуль Юнга, Θ — половина угла наклона зонда, h — глубина проникновения, ν — коэффициент Пуассона. Для клеток эукариот значение ν принимают равным 0,5 [29].

Соответственно, модуль Юнга определяется по формуле:

$$E = \frac{\sqrt{\pi}}{2} (1-\nu^2) \frac{S}{\sqrt{A_c}}, \quad (3)$$

где E — модуль Юнга, S — константа жесткости, ν — коэффициент Пуассона, A_c — контактная жесткость, которая определяется по формуле:

$$A_c = \pi h_c^2 \tan^2 \Theta, \quad (4)$$

где A_c — контактная жесткость, h — глубина проникновения, Θ — половина угла наклона зонда.

Рядом авторов исследована морфология и зарегистрировано изменение упругих свойств клеток эукариот [29].

Режим непрерывного контакта, включающий в себя целый арсенал методов — постоянной высоты, модуляции силы и другие, был успешно использован при исследовании эукариот и их свойств [21, 31, 36, 37] в норме и патологии.

Методом постоянной высоты [31] показана гетерогенность механических свойств эндотелиальных клеток в диапазоне от 1 до 7 кПа. Отмечено, что наиболее жесткими клетками являются миоциты, модуль Юнга которых варьировал в диапазоне от 35 до 43 кПа. Установлено снижение жесткости патологических клеток по сравнению с нормальными: жесткость аденокарциномы $0,5 \pm 0,08$ кПа, что примерно в 4 раза ниже аналогичных показателей для нормальных клеток ($1,93 \pm 0,5$ кПа). Другими исследователями установлено, что наиболее жесткими клетками млекопитающих являются коллагеновые (жесткость 1–2 ГПа [21], 5–11,5 ГПа [37]).

Рядом авторов [36] были найдены различия в значениях модуля Юнга нейтрофилов при взаимодействии с ЛПС. Отмечено, что спустя 83 мин от начала взаимодействия анализируемый параметр увеличивался

в 12,5 раз, достигая при этом значений в 25 кПа (для интактных клеток значения составляли $1,9 \pm 0,3$ кПа).

При исследовании клеток Купфера крыс [37] констатировано химическое разрушение актина под воздействием цитохалазина В и латринкулина А в концентрациях 10 мкг/мл и 0,1 мг/мл, сопровождающееся снижением модуля Юнга в течение 40 мин. При этом наблюдалось уменьшение, а в отдельных случаях увеличение значений модуля Юнга до 6,5 кПа, выбранных клеток при добавлении в питательную среду 20 мМ цитохалазина В с различной экспозицией. Однако в анализируемой нами литературе не было обнаружено данных о широком применении метода АСМ в изучении влияния различных химических веществ, в том числе антибактериальных, антисептических и профилактических препаратов, на клетки эукариот и определение их функционального состояния.

Еще одним параметром, наиболее качественно описывающим состояние клеток эукариот, служит их адгезивная способность (F_{adh}) [13, 16, 19]. Для исследования этих свойств в атомно-силовой микроскопии используется метод модуляции силы режима непрерывного контакта. С использованием этого метода определены адгезивные свойства хондроцитов кроликов к покровному стеклу при культивировании их на питательной среде в течение 1, 2, 4 и 6 ч соответственно. Зарегистрировано увеличение определяемого параметра с 231 ± 149 Па через 1 ч культивирования до 1085 ± 211 Па спустя 6 ч.

В то же время нами не выявлено сведений о применении методов атомно-силовой микроскопии в изучении механических и адгезивных свойств клеточных линий. В связи с этим нами был разработан методический подход к исследованию изменений упругости, модуля Юнга и силы адгезии клеток Vero и ВНК при взаимодействии с аттенуированным штаммом вируса бешенства «Москва 3253». Обнаружено увеличение, а в отдельных случаях снижение выбранных характеристик модельных эукариот, участвующих в процессе взаимодействия, в 1,4–1,7 раза [1, 3].

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что параметры жесткости клетки и ее адгезивность являются демонстративными параметрическими критериями для дифференцирования нормальных и измененных клеток при течении инфекционного процесса. Кроме того, эти показатели могут быть задействованы в качестве интегральных параметров для количественной оценки изменения состояния клетки в условиях взаимодействия вирусных частиц и бактериофагов с клетками эукариот, что может быть использовано как в

лабораторной диагностике инфекционных болезней, так и при производстве терапевтических препаратов.

3. Проблемы и перспективы

Наибольшие успехи применения АСМ в изучении эукариот отражены в трех направлениях [43]: 1) визуализация живых клеток с высоким пространственным разрешением; 2) мониторинг динамических процессов в клетках в режиме реального времени; 3) изучение микро-механических свойств клеток.

В то же время при проведении исследований методом АСМ существуют определенные ограничения. Поскольку клетки про- и эукариот обладают относительной мягкостью по отношению к твердым телам [44], возникает необходимость оптимизации параметров сканирования выбранных объектов исследования. Ранее нами был разработан алгоритм к оптимизации основных параметров сканирования микробных клеток, отраженный в методических рекомендациях «Оптимизация параметров сканирования микроорганизмов методами атомно-силовой микроскопии».

Однако клетки эукариот [20], в том числе и перевиваемые линии Vero и ВНК, обладают большими, по сравнению с прокариотами формами, размерами, адгезивными и эластичными свойствами. Поэтому для данного типа клеток параметры сканирования могут в значительной степени отличаться от аналогичных показателей для прокариот.

В анализируемой литературе [38] отмечено, что для наиболее качественной визуализации взаимодействия модельных клеток с бактериофагами и TMV (tobacco mosaic virus), оптимальное значение резонансной частоты составляло 10 кГц для режима сканирования в жидкости. Для режима прерывистого контакта аналогичный показатель составлял 17–20 кГц, что соответствует показателям для клеток прокариот.

При визуализации клеток сошника [26] полуконтактным методом АСМ установлено, что величина значения коэффициента цепи обратной связи составляет 0,5.

Данные, представленные You et al. [43], продемонстрировали, что оптимальное значение скорости сканирования клеток нейропластомы (SK-N-SH) составляет 0,9 Гц при исследовании клеток в режиме жидкостной АСМ.

Однако в анализируемой литературе не было выявлено сведений о разработке методического подхода к сканированию клеток прокариот и алгоритме получения оптимальных параметров АСМ, необходимых для их изучения. В соответствии с этим и возникает необходимость проведения подобных работ для получения максимальной

информации об объекте исследования. Нами отработаны условия сканирования модельных клеточных линий (Vero и ВНК) и определены оптимальные диапазоны основных параметров сканирования. Полученные результаты в полной мере согласуются с исследованиями как отечественных, так и зарубежных авторов, а также с определенными ранее нами данными для клеток прокариот.

Также определенные проблемы возникают при обработке клеток эукариот для проведения исследования с целью максимальной сохранности клеток для дальнейшего изучения. В ряде работ [26] отмечено использование смеси 2% глутарового альдегида и 2% параформальдегида в течение 30–40 мин [33]. Ряд авторов указывает на возможность использования 0,5% глутарового альдегида в качестве фиксатора [43]. В нашей работе показано, что фиксация 2,5% глутаровым альдегидом наиболее полно сохраняет морфологию и ультраструктуру клеток перевиваемых линий Vero и ВНК при взаимодействии с аттенуированным штаммом вируса бешенства «Москва 3253», а также со специфическими иммуноглобулинами [1, 3].

Перспективным направлением изучения клеток эукариот, в том числе перевиваемых линий, является исследование их взаимодействия с частицами вирусов в зависимости от силы и степени воздействия, а также определение реакции нейтрализации последних. Полученные данные позволят не только качественно, но и количественно определять наличие и концентрацию вируса в растворе по характеру изменения морфофункциональных свойств клеточной стенки перевиваемой линии.

Актуальной задачей в настоящее время является оценка состояния клеток эукариот под воздействием антибактериальных и антисептических средств и вновь создаваемых химических веществ.

Литература

1. Генералов С.В., Ерохин П.С., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Абрамова Е.Г., Щербачева С.А. Изучение ультраструктуры поверхности клеток перевиваемой линии Vero, инфицированных вирусом бешенства // Вопросы вирусологии. — 2017. — Т. 62. — № 5. — С. 227–232.
2. Дяченко С.А. Количественная оценка гликопротеина в вакцинах против бешенства методом иммуноферментного анализа: автореф. ... дис. канд. биол. наук. — Щёлково, 2016. — 27 с.
3. Ерохин П.С., Генералов С.В. Изучение клеточных линий VERO и ВНК при культивировании аттенуированного вируса бешенства «Москва 3253» методом атомно-силовой микроскопии // Мат-лы Всероссийского семинара па-
4. Ерохин П.С., Уткин Д.В., Осина Н.А., Бойко А.В., Кузнецов О.С., Куклев В.Е., Бугоркова Т.В. Современное состояние изучения ультраструктуры поверхности клеточной стенки микроорганизмов в условиях неблагоприятного воздействия факторов биотической и абиотической природы // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия химия, биология, экология. — 2016. — Т. 16. — Вып. 2. — С. 186–189.
5. Журавков М.А., Романова Н.С., Прохоров Н.А. Об определении свойств биоматериалов на основе технологий наноиндентирования. Часть 2. Методики определения точки контакта в методе силовой спектроскопии // Механика машин, механизмов и материалов. — 2015. — № 1(30). — С. 58–65.
6. Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Волох О.А., Осина Н.А. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии // Проблемы особо опасных болезней. — 2012. — Вып. 112. — С. 62–64.
7. Яминский И.В., Демин В.В., Бондаренко В.М. Различия в клеточной поверхности гибридных бактерий *Escherichia coli* K12, наследующих rfb-a3,4 ген *Shigella flexneri*, выявляемые с помощью атомно-силовой микроскопии // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 1997. — № 6. — С. 15–18.
8. Azzouz N., Kamena F., Laurino P., Kikkeri R., Mercier C., Cesbron-Delauw M.-F., Dubremetz J.-F., De Cola L., Seeberger P.H. *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures // Glycobiology. — 2013. — Vol. 23. — No. 1. — P. 106–120.
9. Baik K.Y., Ogay V., Jeoung S.C., Soh K.-S. Visualization of Bonghan microcells by electron and atomic force microscopy // J. Acupunct. Meridian. Stud. — 2009. — Vol. 2. — No. 2. — P. 124–129.
10. Benoit M., Gabriel D., Gerisch G., Gaub H.E. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy // Nat. Cell Biol. — 2000. — Vol. 2. — P. 313–317.
11. Benoit M., Gaub H.E. Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level // Cells, Tissues, Organs. — 2002. — Vol. 172. — P. 174–189.
12. Chen T., Chen K. Investigation and application progress of Vero cell serum-free culture // International Journal of Biology. — 2009. — Vol. 1. — No. 2. — P. 41–47.
13. Curtis A.S.G., Forrester J.V. The competitive effects of serum proteins on cell adhesion // J. Cell Sci. — 1984. — Vol. 71. — P. 17–35.

14. *Dufrene Y.F.* Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells // *Micron*. – 2001. – Vol. 32. – P. 153–165.
15. *Dufrene Y.F.* Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology // *J. of Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – No. 19. – P. 5205–5213.
16. *Fohlerova Z., Skladal P., Turanek J.* Adhesion of eukaryotic cell lines on the gold surface modified with extracellular matrix proteins monitored by the piezoelectric sensor // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2007. – Vol. 22. – P. 1896–1901.
17. *Fuhrmann A., Ros R.* Single-molecule force spectroscopy: a method for quantitative analysis of ligand-receptor interactions // *Nanomed.* – 2010. – Vol. 5. – No. 4. – P. 657–666.
18. *Giron J.A., Torres A.G., Freer E., Kaper J.B.* The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells // *Molecular Microbiology*. – 2002. – Vol. 44. – No. 2. – P. 361–379.
19. *Grinnell F., Feld M.K.* Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – Vol. 257. – No. 9. – P. 4888–4893.
20. *Hansma H.G., Laney D.E., Bezanilla M., Sinsheimer R.L., Hansma P.K.* Applications for atomic force microscopy of DNA // *Biophysical Journal*. – 1995. – Vol. 68. – P. 1672–1677.
21. *Heim A.J., Matthews W.G., Koob T.J.* Determination of the elastic modulus of native collagen fibrils via radial indentation // *Appl. Phys. Lett.* – 2006. – Vol. 89. – P. 181902–181904.
22. *Helenius J., Heisenberg C.-P., Gaub H.E., Muller D.J.* Single-cell force spectroscopy // *Journal of Cell Science*. – 2008. – Vol. 121. – No. 11. – P. 1785–1791.
23. *Huang W., Anvari B., Torres J.H., LeBaron R.G., Athanasiou K.A.* Temporal effects of cell adhesion on mechanical characteristics of the single chondrocyte // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2003. – Vol. 21. – P. 88–95.
24. *Jastrzebska M., Zalewska-Rejda J., Mroz I., Barwinski B., Wrzalik R., Kocot A., Nozynski J.* Atomic force microscopy and FT-IR spectroscopy investigations of human heart valves // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2006. – Vol. 25. – P. 231–244.
25. *Jeong K.H., Kim K.S., Lee G.J., Choi S.J., Jeong T.J., Shin M.-K., Park H.K., Sim W.Y., Lee M.-H.* Investigation of aging effects in human hair using atomic force microscopy // *Skin Research and Technology*. – 2011. – Vol. 17. – P. 63–68.
26. *Khalili A.A., Ahmad M.R.* A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 18149–18184.
27. *Kontomaris S.V., Stylianou A.* Atomic force microscopy for university students: applications in biomaterials // *Eur. J. Phys.* – 2017. – Vol. 38(3). doi.org/10.1088/1361-6404/aa5cd6.
28. *Kreplak L., Wang H., Aebi U., Kong X.-P.* Atomic force microscopy of mammalian urothelial surface // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 374. – No. 2. – P. 365–373.
29. *Li M., Liu L.-Q., Xi N., Wang Y.-C.* Nanoscale monitoring of drug actions on cell membrane using atomic force microscopy // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2015. – Vol. 36(7). – P. 769–782.
30. *Litvinov R.I., Shuman H., Bennett J.S., Weisel J.W.* Binding strength and activation state of single fibrinogen-integrin pairs on living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99. – P. 7426–7431.
31. *Mathur A.B., Truskey G.A., Reichert W.M.* Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells // *Biophys. J.* – 2000. – Vol. 78. – P. 1725–1735.
32. *Moloney M., McDonnell L., O’Shea H.* Atomic force microscopy analysis of enveloped and non-enveloped viral entry into, and egress from, cultured cells // *Ultramicroscopy*. – 2004. – Vol. 100(3–4). – P. 163–169.
33. *Ohnesorge F.M., Horber J.K.H., Haberland W., Czerny C.-P., Smith D.P.E., Binnig G.* AFM review study on pox viruses and living cells // *Biophysical Journal*. – 1997. – Vol. 73. – P. 2183–2194.
34. *Osada T., Takezawa S., Itoh A., Arakawa H., Ichikawa M., Ikai A.* The distribution of sugar chains on the vomeronasal epithelium observed with an atomic force microscope // *Chem. Senses*. – 1999. – Vol. 24. – No. 1. – P. 1–6.
35. *Ouerghi O., Touhami A., Othmane A., Ouada H.B., Martelet C., Fretigny C., Jaffrezic-Renault N.* Investigation antibody-antigen binding with atomic force microscopy // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2002. – Vol. 84(2–3). – P. 167–175.
36. *Plesrova S.N., Guschina Yu.Yu., Zvonkova M.B.* Apoptosis of the human neutrophils under the lipopolisaccharide (LPS) of the *Proteus mirabilis* conditions observed in real time by atomic force microscopy (AFM) // *NSTI-Nanotech*. – 2005. – Vol. 1. – P. 377–380.
37. *Rotsch C., Braet F., Wisse E., Radmacher M.* AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages // *Cell Biology International*. – 1997. – Vol. 21. – No. 11. – P. 685–696.
38. *Schabert F.A., Rabe J.P.* Vertical dimension of hydrated biological samples in tapping mode scanning force microscopy // *Biophysical Journal*. – 1996. – Vol. 70. – P. 1514–1520.
39. *Stukalov O., Korenevsky A., Beveridge T.J., Dutcher J.R.* Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74. – No. 17. – P. 5457–5465.
40. *Wang C.-C., Hsu Y.C., Su F.C., Lu S.C., Lee T.M.* Effects of passivation treatments on titanium alloy with nanometric scale roughness and induced changes in fibroblast initial adhesion evaluated by a cytotetacher // *Journal of Biomedical*

- Materials Research. Part A. — 2008. — Vol. 88(2). — P. 370–383.
41. Wenger M.P.E., Bozec L., Horton M.A., Mesquidaz P. Mechanical properties of collagen fibrils // Biophys. J. — 2007. — Vol. 93. — P. 1255–1263.
42. Wiltzer L., Okada K., Yamaoka S., Larrous F., Kuusisto H.V., Sugiyama M., Blondel D., Bourhy H., Jans D.A., Ito N., Moseley G.W. Interaction of rabies virus P-Protein with STAT proteins is critical to lethal rabies disease // Journal of Infectious Diseases. — 2014. — Vol. 209(11). — P. 1744–1753.
43. You H.X., Yu L. Atomic force microscopy imaging of living cells: progress, problems and prospects // Methods in Cell Science. — 1999. — Vol. 21. — P. 1–17.
44. Zhang Y., Sheng S.(J.), Shao Z. Imaging biological structures with the cryo atomic force microscope // Biophysical Journal. — 1996. — Vol. 71. — P. 2168–2176.
45. Zhou D.W., Garcia A.J. Measurement systems for cell adhesive forces // Journal of Biomechanical Engineering. — 2015. — Vol. 137(2). — 020908. doi: 10.1115/1.4029210.

THE USE OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN STUDYING THE EUKARYOTIC CELL ULTRASTRUCTURE

P.S. EROKHIN, S.V. GENERALOV, D.V. UTKIN, O.S. KUZNETSOV,
E.G. ABRAMOVA, N.A. OSINA

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

The review provides basic information on the use of atomic force microscopy in studies of eukaryotic cells. The methods of atomic force microscopy have been used in the study of the ultrastructure and morphological features of eukaryotic cells, their mechanical properties, etc. The prospects for developing methods of atomic force microscopy as a tool for studying cells of transplantable lines are discussed.

Keywords: eukaryotes, transplantable lines, atomic force microscopy methods, semi-contact method, contact mode.

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИЗУЧЕНИЯ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ МИКРОСКОПИИ

О.С. КУЗНЕЦОВ*, А.В. КАЗАНЦЕВ, П.С. ЕРОХИН, Д.В. УТКИН,
Н.А. ОСИНА, С.П. ЗАДНОВА, Г.А. ЕРОШЕНКО

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

В обзоре представлены данные об использовании различных видов микроскопии (электронной, лазерной сканирующей конфокальной и атомно-силовой микроскопии) в изучении строения и свойств биопленок микроорганизмов.

Ключевые слова: биопленка, ЭПС, атомно-силовая микроскопия, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, электронная микроскопия.

Введение

В последние годы накоплены данные о взаимодействии отдельных клеток в бактериальной популяции, необходимом для выживания в меняющихся экологических условиях, а также для установления симбиотических или паразитических взаимоотношений с многоклеточными организмами — животными и растениями [27]. Координированная деятельность клеток и обмен информацией между бактериями в популяции осуществляется с помощью специализированных химических и сигнальных молекул — аутоиндукторов, которые включают или выключают определенные группы генов. Это явление получило название quorum sensing [7]. Система quorum sensing регулирует целый ряд активностей у различных микроорганизмов, в том числе образование биопленок, биолюминесценцию, споруляцию и др. [8, 12]. Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы используют различные сигнальные системы и разные химические передатчики сигналов [12].

Биопленки — это высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества бактерий, которые состоят как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся форм, заключенных в экзополимерный матрикс [12]. Они могут состоять из одного или нескольких видов микроорганизмов [7, 12]. Образование биопленок — это сложный

комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов: адгезии клеток на поверхности и перераспределения клеточной массы; активного деления клеток для создания клеточных кластеров; образования экзополимерного слизистого матрикса [20]. Адгезирующие микроорганизмы способны формировать биопленки и сохранять свою жизнеспособность в течение длительного времени [36]. Изначальное прикрепление микробной клетки к поверхности осуществляется за счет действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван-дер-Ваальса, неспецифической адгезии.

Адгезия к биологическим поверхностям обуславливается специфическим взаимодействием белков адгезинов или лектинов фимбрий экзоплазматического компартмента бактериальной клетки с рецепторами или определенными доменами поверхности мембран клеток-мишеней [18].

Для грамположительных бактерий важнейшим элементом в процессе адгезии служит полисахарид (например, у стафилококков), который участвует как в клеточной субстратной адгезии, так и в последующем формировании клеточных кластеров. В механизме адгезии и клеточной агрегации грамотрицательных микроорганизмов важную роль играют жгутики и фимбрии IV типа. Движение, обусловленное жгутиками, способствует распространению клеточного монослоя на субстрате, а в клеточной агрегации, которая осуществляется за счет лектинового взаимодействия, участвуют фимбрии [3].

Для многих бактерий установлена связь между образованием жгутиков и способностью к формированию биопленки, поскольку штаммы, обладающие сниженной подвижностью, дефектны по образованию биопленки [30]. Ключевым моментом образования биопленок микроорганизмами является способность после необратимой

© 2019 г. Кузнецов О.С., Казанцев А.В., Ерохин П.С., Уткин Д.В., Осина Н.А., Заднова С.П., Ерошенко Г.А.

* **Автор для переписки:**

Кузнецов Олег Святославович

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

E-mail: rustrapi@microbe.ru

адгезии интенсивно пролиферировать с образованием многоклеточных слоев и синтезировать компоненты экзополимерного матрикса [3]. Экзополисахаридный матрикс (ЭПС) биопленки защищает бактерии, входящие в ее состав, от токсического воздействия антибактериальных препаратов [28], термального стресса [11], иммунитета хозяина [39] и других воздействий [14, 15, 22, 26].

В данном обзоре представлены сведения об использовании отдельных видов микроскопии в исследовании микробных сообществ — биопленок. В последние годы наиболее часто в этой области используются методы электронной [41], лазерной сканирующей конфокальной [43] и атомно-силовой микроскопии (АСМ) [35]. Каждое из этих технических средств изучения позволяет получать сведения об особенностях строения и свойствах объекта исследования, обладая при этом своими достоинствами и недостатками.

Электронная микроскопия в изучении биопленок

Этот вид микроскопии позволяет проводить исследование с разрешением в единицы нанометров и выше [10] и включает в себя трансмиссионную электронную и растровую (сканирующую) электронную микроскопию.

Методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [16, 37, 41] на примере модельных микроорганизмов было показано, что при инкубации бактерий на питательной среде в течение 24 ч с добавлением 2 мл 20% глюкозы 54,8% штаммов образуют прочно связанное сообщество. Кроме того, этим методом выявлен экзополисахарид *Staphylococcus aureus* и *Yersinia pestis*. Установлено [2], что на начальных этапах формирования биопленки на кварцевых подложках участвуют от 5 до 20 бактерий. При этом отмечен рост размеров бактерий в 1,2–1,3 раз в зависимости от длительности формирования. Показаны различные морфологические формы бактерий (цилиндрические и сферические) в зависимости от этапа процесса формирования сообщества.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) была использована для изучения формирования биопленки чумного микроба (*Y. pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*). Показано, что возбудитель чумы способен формировать сообщество как на биотической поверхности (нематоды *Caenorhabditis elegans*) [222], так и абиотической — покровном стекле [1, 21, 25].

В то же время проведенное электронно-микроскопическое исследование продемонстрировало, что клетки микроорганизмов, составляющих биопленки, заключены во внеклеточный матрикс [25].

Методами ТЭМ и СЭМ были показаны решетчатые структуры поверхностных белков S-слоя возбудителей особо опасных инфекционных болезней размером 7–9 нм для *Bacillus anthracis* со строго выраженной наклонной симметрией [11].

При изучении бактерий *Escherichia coli* авторами констатированы отдельные этапы формирования биопленки [19]. При этом электронно-микроскопическое исследование позволило выявить мукоидный матрикс сообщества.

Метод лазерной сканирующей конфокальной микроскопии

Сейчас у исследователей имеется целый ряд моделей оптических микроскопов, в том числе и лазерного сканирующего оптического (ЛКСМ). Этот метод был впервые применен в микробиологических исследованиях в 1961 г. [40].

ЛКСМ были использованы в различных задачах микробиологии — взаимодействие молекул различного типа [32], исследование динамических процессов, происходящих в живых клетках [33], формирование 3D изображений бактерий и их сообществ [23, 32] и другие.

В настоящее время метод ЛКСМ задействован рядом авторов для изучения микробных сообществ — биопленок [31].

При мониторинге начальных этапов формирования биопленок на примере *Pseudomonas aeruginosa* обнаружено выделение специфических веществ, необходимых для пространственной организации микробного сообщества [42]. Показано, что ЭПС стабилизирует пространственную структуру биопленок *Vibrio cholerae* Эль-Тор биовара [46].

На примере грамположительных (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*) бактерий отмечено, что под воздействием D-аминокислот формируются сообщества в течение 24 ч на полистироловых подложках. Начальные этапы формирования (первые 2–12 ч) зависят от наличия кислот в среде культивирования. Внеклеточный матрикс, образующийся в процессе формирования биопленки, защищает бактерии, входящие в состав сообщества, в ответ на влияние D-аминокислот [24]. ЛКСМ обладает преимуществом, по сравнению с электронной микроскопией, по времени подготовки объекта исследований.

Однако ЛКСМ, как и другие методы, имеет ряд недостатков. Одним из них представляется разрешающая способность, ограниченная пределами в 150–300 нм, обусловленными дифракционными пределами Аббе, что бывает недостаточно для выявления особенностей ультраструктуры бактерий.

Атомно-силовая микроскопия

АСМ обладает высоким пространственным разрешением: 1 нм и меньше — боковое, 0,1 нм — вертикальное разрешение. Высокое разрешение методов АСМ способствует изучению архитектоники, особенности строения и состава биологических пленок [35]. Так, при исследовании контактным методом, методом латеральных сил, а также в бесконтактном режиме АСМ получены изображения биопленок *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus oryzae*. Показано, что ЭПС имеет гранулярную структуру с латеральными размерами 30–50 нм с вертикальной шероховатостью 10 нм [34]. Полуконтактным методом АСМ определены линейные размеры отдельных бактерий, входящих в состав биопленки, на примере *Pseudomonas fluorescens* [38].

Методами контактной сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) изучены упругие свойства бактерий, входящих в состав биопленки в условиях неблагоприятного действия NaCl на *E. coli*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*. Установлено, что сила жесткости варьировала в диапазоне от 0,16±0,1 Н/м до 0,41±0,1 Н/м [45]. При изучении показателя жесткости бактериальных клеток *P. aeruginosa* после обработки 2,5% глутаральдегидом было выявлено изменение константы жесткости с 0,044±0,002 Н/м до 0,11±0,03 Н/м [44].

Проведенные исследования воздействия осмотического и оксидативного стрессов на микробную клетку, на примере возбудителя холеры типичного штамма биовара Эль-Тор и его геноварианта [4, 6] продемонстрировали повышенную устойчивость штаммов биовара Эль-Тор благодаря наличию экзополисахаридного слоя на поверхности клеток, как типичных штаммов, так и геновариантов [6]. На начальном этапе формирования биопленок микроорганизмов в зависимости от времени воздействия хлорида натрия на бактерии происходило увеличение шероховатости поверхности клеточной стенки микроорганизма до 2–2,1 раз и силы адгезии в 1,3 раза по сравнению с контролем [4]. В то же время у геновариантов *V. cholerae* регистрировали формирование дополнительного экзополисахаридного слоя на более ранних сроках по сравнению с типичными штаммами.

Ряд авторов установил широкие возможности применения методов АСМ при изучении упругих свойств бактерий, способствующих более глубокому пониманию вопросов структуры и свойств клеточной поверхности микроорганизма [13, 29, 38]. Обнаружено, что сообщество микроорганизмов формируется более активно на шероховатой поверхности, что сопровождается увели-

чением силы трения и энергии адсорбции сообщества микроорганизмов к подложке.

Методами атомно-силовой микроскопии [9] проведена оценка влияния серотонина на морфометрические и топографические характеристики клеток вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ(Сар+) и его бескапсульного варианта *F. tularensis* КМ-9(Сар-). Методами атомно-силовой микроскопии обнаружено, что при выращивании *F. tularensis* 15 НИИЭГ(Сар+) на FT агаре в присутствии серотонина толщина капсулоподобного вещества, окружающего бактериальные клетки, увеличивалась в среднем в 3 раза и составляла 95,1±0,56 нм против 31,7±0,18 нм в контроле (без серотонина). При аналогичном выращивании *F. tularensis* КМ-9(Сар-) такого явления не обнаружено. Установлено, что в образовании биопленки важную роль играет капсулоподобное вещество туляремийного микроба. Полученные данные открывают возможность сделать предположение об особой роли серотонина в процессах формирования биопленочного сообщества, в составе которого бактерии защищены от повреждающих факторов внешней среды.

Проведенный анализ ультраструктуры биопленок грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов на примере *E. coli* и *S. aureus* позволил разработать комплексный подход к их изучению [5]. Для этого получали панель изображений следующими методами: полуконтактным, рассогласования и отображения фазы в режиме прерывистого контакта или контактным методом, методом латеральных сил и модуляции силы в режиме непрерывного контакта.

С использованием программного обеспечения Nova (НТ-МДТ, Россия) к СЗМ SolverP47-PRO (НТ-МДТ, Россия) определяли параметры микробных сообществ: индекс I (у *S. aureus* — 1, для *E. coli* — 1,02), шероховатость (10 и 30 нм) и силу адгезии клеток (18 и 16 нН), входящих в состав биопленок, а также толщину (250 нм у *E. coli* и 70 нм у *S. aureus*) и силу адгезии внеклеточного матрикса. Затем осуществляли математическое суммирование изображений панели для каждого режима сканирования. Полученные объединенные изображения в более полной мере позволяли проводить характеристику микробных сообществ, их пространственную организацию, состав и структурные особенности.

Таким образом, суммируя проанализированные литературные данные и результаты собственных исследований можно сделать вывод о том, что представленные выше виды микроскопии дают возможность в полной мере проводить исследования ультраструктуры и физи-

ческих свойств биопленок микроорганизмов. При этом каждый из используемых методов исследования может дополнять результаты других исследований, что может быть полезно в лабораторной диагностике инфекционных болезней, а также в фундаментальных исследованиях.

Литература

1. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Образование биопленки у штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Астраханской области // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2010. — № 3. — С. 3–7.
2. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Формирование биопленки штаммами *Yersinia pestis* основного и неосновного подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* на модели *Caenorhabditis elegans* // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 1(99). — С. 31–34.
3. Дерябин Д.Г., Васильченко А.С., Алешина Е.С., Тлягулова А.С., Никиян А.Н. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии // Росс. нанотех. — 2010. — Т. 5. — № 11–12. — С. 136–141.
4. Ерохин П.С., Коннов Н.П., Заднова С.П., Бугоркова Т.В. Динамическая характеристика микроорганизмов в условиях неблагоприятного действия факторов абиотической природы методом сканирующей зондовой микроскопии // Вестник Саратовского государственного технического университета. — 2015. — № 4(81). — С. 23–28.
5. 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. — Вып. 1. — С. 43–47.
6. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Крепостнова И.М., Ерохин П.С., Смирнова Н.И. Влияние осмотического и оксидативного стрессов на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2015. — № 6. — С. 55–62.
7. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.А. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. — 2004. — № 40. — С. 1–12.
8. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.А. Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенезе // Молек. генет., микробиол. и вирусол. — 2006. — № 3. — С. 22–29.
9. Клюева С.Н., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Ерохин П.С., Кузнецова Е.М., Волох О.А. Оценка стимулирующего влияния биогенного амина серотонина на капсулоподобное вещество *Francisella tularensis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2016. — № 4. — С. 9–16.
10. Коннов Н.П., Волков Ю.П., Кузнецов О.С. Современные возможности изучения трехмерной (3D) ультратонкой структуры и визуализации микроорганизмов // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — Вып. 112. — С. 29–34.
11. Кузнецов О.С. Экспериментальные подходы к изучению тонкой трехмерной морфологии клеток возбудителей чумы, холеры и сибирской язвы и некоторые особенности их поверхностных ультраструктур: дис. ... канд. биол. наук. — Саратов, 2010. — 113 с.
12. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиол. — 2010. — Т. 79. — № 4. — С. 435–446.
13. Ahimou F., Semmens M.J., Novak P.J., Haugstad G. Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology // Appl. and Environ. Microbiol. — 2007. — Vol. 73. — No. 9. — P. 2897–2904.
14. Anandkumar B., Rajasekar A., Venkatachari G., Maruthamuthu S. Effect of thermophilic sulphate-reducing bacteria (*Desulfotomaculum geothermicum*) isolated from Indian petroleum refinery on the corrosion of mild steel // Curr. Sci. — 2009. — Vol. 97. — No. 3. — P. 342–348.
15. Antoce A.O., Namolosanu I.C. A rapid method for testing yeast resistance to ethanol for the selection of strains suitable for winemaking // Roman. Biotechnol. Lett. — 2011. — Vol. 16. — No. 1. — P. 5953–5962.
16. Balikoglu-Yilmaz M., Yilmaz T., Cetinel S., Taskin U., Esen A.B., Taskapili M., Kose T. Comparison of scanning electron microscopy findings regarding biofilm colonization with microbiological results in nasolacrimal stents for external, endoscopic and transcanalicular dacryocystorhinostomy // Int. J. Ophthalmol. — 2014. — Vol. 14. — No. 3. — P. 534–540.
17. Beech I.B. Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion // Microbiol. Today. — 2003. — Vol. 30. — P. 115–117.
18. Burks G.A., Velegol S.B., Paramonova E., Lindenmuth B.E., Feik J.D., Logan B.E. Macroscopic and nanoscale measurements of the adhesion of bacteria with varying outer layer surface composition // Langmuir. — 2003. — Vol. 19. — P. 2366–2371.
19. Didenko L.V., Tolordava E.R., Peranova T.S., Shevlyagina N.V., Borovaya T.G., Romanova Yu.M., Cazzaniga M., Curia R., Milani M., Savoia C., Tatti F. Electron microscopy investigation of urine stones suggests how to prevent post-operation septic complications in nephrolithiasis // Journal of Applied Medical Sciences. — 2014. — Vol. 3. — No. 4. — P. 19–34.
20. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 8. — No. 9. — P. 881–990.

21. Eroschenko G.A., Vidyayeva N.A., Kutnyrev V.V. Comparative analysis of biofilm formation by main and nonmain subspecies *Yersinia pestis* strains // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 59. – P. 513–520.
22. Flemming H.C., Neu T.R., Wozniak D.J. The EPS matrix: the «house of biofilm cells» // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. – No. 22. – P. 7945–7947.
23. Heidrich M., Kuhnel M.P., Kellner M., Lorbeer R.-A., Lange T., Winkel A., Stiesch M., Meyer H., Heisterkamp A. 3D imaging of biofilms on implants by detection of scattered light with a scanning laser optical tomograph // Biomedical Optics Express. – 2011. – Vol. 2. – No. 11. – P. 2982–2994.
24. Hochbaum A.I., Kolodkin-Gal I., Foulston L., Kolter R., Aizenberg J., Losick R. Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development // Journal of Bacteriology. – 2011. – Vol. 193. – No. 20. – P. 5616–5622.
25. Joshua G.W.P., Karlyshev A.V., Smith M.P., Isherwood K.E., Titball R.W., Wren B.W. A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface // Microbiology. – 2003. – Vol. 149. – P. 3221–3229.
26. Karbiuskiy V.L., Korniyuk T.A. Application of UHV-AFM for investigation of structure of plant viruses and their interaction with Si (III) surface // Ukrain. Bioorgan. Acta. 2009. – Vol. 2. – P. 7–11.
27. Kievit T., Iglewsky B. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships // Infect. and Immun. – 2000. – Vol. 68. – No. 9. – P. 4839–4849.
28. Landry R.M., An D., Hupp J.T., Singh P.K., Parsek M.R. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance // Mol. Microbiol. – 2006. – Vol. 59. – No. 1. – P. 142–151.
29. Lau P.C.Y., Dutcher J.R., Beveridge T.J., Lam J.S. Absolute quantitation of bacterial biofilm adhesion and viscoelasticity by microbead force spectroscopy // Biophys. J. – 2009. – Vol. 96. – P. 2935–2948.
30. Lemon K., Higgins D., Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation // J. of Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. – P. 4418–4424.
31. Murray J.M. Confocal microscopy, deconvolution and structured illumination methods // Cold Spring Harbor Protocols, 2011. doi:10.1101/pdb.top066936.
32. Nan Y.H., Park K.H., Park Y., Jeon Y.J., Kim Y., Park I.-S., Hahm K.-S., Shin S.Y. Investigating the effects of positive charge and hydrophobicity on the cell selectivity, mechanism of action and anti-inflammatory activity of a Trp-rich antimicrobial peptide indolicidin // FEMS Microbiol. Lett. – 2009. – Vol. 292. – P. 134–140.
33. Packroff G., Lawrence J.R., Neu T.R. In situ confocal laser scanning microscopy of protozoans in cultures and complex biofilm communities // Acta Protozool. – 2002. – Vol. 41. – P. 245–253.
34. Pham D.K., Ivanova E.P., Wright J.P., Nikolau D.V. AFM analysis of the extracellular polymeric substances (EPS) released during bacterial attachment on polymeric surfaces // Proc. SPIE. – 2003. – Vol. 4962. – P. 151–159.
35. Ramey B.A., Koutsoudis M., von Bodman S.B., Fukua C. Biofilm formation in plant-microbe associations // Curr. Opin. in Microbiol. – 2004. – Vol. 7. – P. 602–609.
36. Razatos A., Ong Y.-L., Sharma M.M., Georgiou G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. – Vol. 95. – No. 19. – P. 11059–11064.
37. Schaudinn C., Carr G., Gorur A., Jaramillo D., Costerton J.W., Webster P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM – SEM) // Journal of Microscopy. – 2009. – Vol. 235. – No. 2. – P. 124–127.
38. Schilardi P., Diaz C., Flores C., Alvares F., de Mele M.F.L. Atomic force microscopy and optical microscopy: suitable tools for the study of the initial stages of biofilm formation / In book: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. A. Mendéz Vilas (Ed.). – Formatex, 2010. – P. 860–869.
39. Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg P.E., Welsh M.J. A component in innate immunity prevents bacterial biofilm development // Nature. – 2002. – Vol. 417. – P. 552–555.
40. Stefan W. Hell far-field optical nanoscopy // Science. – 2007. – Vol. 316. – P. 1153–1158.
41. Taj Y., Essa F., Aziz F., Kazmi S.U. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* // J. Infect. Dev. Ctries. – 2012. – Vol. 5. – No. 6. – P. 403–409.
42. Tolker-Nielsen T., Molin S. Spatial organization of microbial biofilm communities // Microb. Ecol. – 2000. – Vol. 40. – P. 75–84.
43. Tomas I., Henderson B., Diz P., Donos N. In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: Methodological approaches / In book: Microscopy: Science, Technology, Applications and Education, Chapter: Applications in Biology and Medicine, Publisher: Formatex Research Center. A. Méndez-Vilas, J. Diaz (Eds.). – Formatex, 2010. – P. 597–606.
44. Vadillo-Rodriguez V., Beveridge T.J., Dutcher J.R. Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force // Bacteriol. – 2008. – Vol. 190. – No. 12. – P. 4225–4232.
45. Volle C.B., Ferguson M.A., Aidala K.E., Spain E.M., Nunes M.E. Spring constants and adhesive properties of native bacterial biofilm cells measured by atomic force microscopy // Coll. and Surf. B: Bioint. – 2008. – Vol. 67. – No. 1. – P. 32–40.
46. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol. 34. – P. 586–595.

MODERN POSSIBILITIES OF STUDYING MICROBIAL BIOFILMS BY VARIOUS TYPES OF MICROSCOPY

O.S. KUZNETSOV, A.V. KAZANTSEV, P.S. EROKHIN, D.V. UTKIN,
N.A. OSINA, S.P. ZADNOVA, G.A. EROSHENKO

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

The review presents data on the use of various types of microscopy (electron, laser scanning confocal and atomic force microscopy) in the study of the structure and properties of biofilms of microorganisms.

Keywords: biofilm, EPS, atomic force microscopy, laser scanning confocal microscopy, electron microscopy.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2019 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1859 — публикация книги Дарвина «Происхождение видов путем естественного отбора».

1869 — открытие периодического закона Д.И. Менделеева.

1869 — Фридрих Мишер открыл в клеточных ядрах «нуклеин», позднее (1889) названный «нуклеиновая кислота».

1884 — создание Пастером вакцины от бешенства.

1889 — Гуго де Фриз постулировал, что «наследование специфических черт организма осуществляется через частицы», назвав последние «(пан)генами».

1889 — Рихардом Альтманом (1852–1901) предложен термин «нуклеиновые кислоты»; он же разработал первый удобный и общий способ выделения нуклеиновых кислот, свободных от белковых примесей.

1894 — выход в свет книги У. Бэтсона «Материалы по изучению прерывистой изменчивости в происхождении видов», в которой он изложил свою теорию прерывистой изменчивости.

1899 — открытие бактериофагов (Гамалея Н.Ф.).

1904 — У. Бэтсон ввел понятие «сцепление генов».

1909 — введение термина «ген» (Йогансен В., 1857–1927). Ученый представил его в своей книге «Элементы точного учения о наследственности». Им же ранее были предложены термины «генотип» и «фенотип».

1909 — Левин Фебус (Levene Ph.A.Th., 1869–1940), ученик И.П. Павлова и А.П. Бородина, эмигрировал в США. В этом году он заложил основы своей тетрануклеотидной гипотезы строения нуклеиновых кислот (оказавшейся ошибочной).

1919 — 100 лет со времени публикации венгерским инженером Карлом Эреки (1878–1952) книги на немецком языке в Берлине: «Биотехнология производства мяса, жира и молока на крупной сельскохозяйственной ферме».

1929 — открытие химической формулы дезоксирибозы (Левин Ф.).

1929 — публикация работы А. Флеминга об открытии пенициллина.

1934 — английский физик Джон Десмонд Бернал и Дороти Кроуфут (Ходжкин) — будущий лауреат Нобелевской премии по химии 1964 года — представили первую рентгенограмму белка (кристаллы фермента пепсина).

1939 — начало экспериментов А.Н. Белозерского, доказавших наличие ДНК и РНК в бактериях.

1944 — публикация результатов экспериментов О. Эйвери с коллегами о наследственном материале, вызывающем трансформацию бактерий, с доказательством того, что ДНК является носителем генетической информации.

1944 — выход в свет книги Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?» (E. Schroedinger. What is life? Cambridge University Press, 1944).

1959 — присуждение Нобелевской премии С. Очоа и А. Корнбергу.

1959 — основание Института химии природных соединений АН СССР (ныне — Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

1964 — Х. Темин (1934–1994) предложил гипотезу ДНК-провируса, предположив таким образом возможность обратной транскрипции: от РНК к ДНК.

1964 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине К. Блоку (1912–2002) и Ф.Ф.К. Линену (1911–1979) за открытия, связанные с механизмом и регуляцией холестерина и жирных кислот.

* Материал подготовлен О.В. Коломбет

1969 — вручение Нобелевской премии М. Дельбрюку, А. Херши, С. Луриа.

1969 — химический синтез искусственного гена, кодирующего аланиновую тРНК дрожжей (Корана Х.Г.).

1969 — выход на русском языке книги Дж. Уотсона «Двойная спираль».

1969 — присуждение А.А. Баеву с коллегами Государственной премии СССР за определение полной нуклеотидной последовательности валиновой тРНК пекарских дрожжей (1967).

1974 — 35 лет со дня написания и публикации П. Бергом с коллегами открытого письма о потенциальной опасности использования рекомбинантных ДНК.

1974 — разработка Фредериком Сенгером метода секвенирования ДНК.

1974 — публикация статьи С. Коэна и Г. Бойера об экспрессии чужеродного гена, имплантированного в бактерии с помощью методов рекомбинантной ДНК.

1979 — разработан метод клонирования ДНК, позволяющий выделять и клонировать тысячи различных генов (Bender W.W., Hogness D.S.).

1979 — сообщение о клонировании гена гормона роста человека (Baxter John).

1979 — в лаборатории William J. Rutter из Калифорнийского университета в Сан-Франциско (UCSF) выделен белок оболочки вируса, вызывающего гепатит В.

1979 — синтез генов соматостатина и инсулина с помощью метода рекомбинантной ДНК.

1984 — разработка метода генетических «отпечатков пальцев» — «DNA finger printing technique» (Джеффис А.).

1984 — открытие механизма передачи генов от почвенных бактерий рода *Agrobacterium* в растения (Van Montagu M., Schell J.).

1984 — вручение Нобелевской премии Ж. Келеру и С. Мильштейну за получение моноклональных антител.

1984 — Стенфордский университет получил патент на производство ДНК прокариот.

1989 — создание в США Национального центра по исследованию генома человека во главе с лауреатом Нобелевской премии Джеймсом Уотсоном.

1989 — 30 лет со дня вручения Нобелевской премии по физиологии и медицине Дж.М. Бишопу и Х.Э. Вармусу за открытие клеточного происхождения ретровирусных онкогенов.

1999 — создание первого растения с измененной пищевой ценностью: риса, содержащего бета-каротин (так называемый «золотой рис»).

1999 — расшифрован геном дрозофилы.

2004 — расшифрован геном крысы.

ПЕРСОНАЛИИ

210 лет со дня рождения Чарльза Дарвина (12 февраля 1809–1882).

185 лет со дня рождения Д.И. Менделеева (8 февраля 1834–1907).

170 лет со дня рождения и 100 лет со дня смерти Уильяма Ослера (William Osler, 1849–1919), канадского терапевта.

150 лет со дня рождения Фебуса Левина (Phoebus Levene, 1869–1940), русско-американского биохимика, ученика И.П. Павлова и А.П. Бородин, автора тетрауклеотидной гипотезы.

125 лет со дня рождения и 35 лет со дня смерти Владимира Александровича Энгельгардта (1894–1984), отечественного биохимика.

125 лет со дня рождения Льва Александровича Зильбера (1894–1966), отечественного вирусолога.

120 лет со дня рождения Фрица Альберта Липмана (Fritz Albert Lipmann, 1899–1986), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие коэнзима А (1953, вместе с Х. Кребсом, который получил ее за открытие цикла лимонной кислоты).

120 лет со дня рождения Альбера Клода (1899–1983), бельгийского цитолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, вместе с Дж. Паладе и К. Де Дювом) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

120 лет со дня рождения Макфарлейна Фрэнка Бернета (M.F. Burnet, 1899–1985), австралийского иммунолога и вирусолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с П. Медавара) за открытие искусственной иммунной толерантности.

120 лет со дня рождения Александра Николаевича Несмеянова (1899–1980), отечественного химика-органика, президента АН СССР (1951–1961).

115 лет со дня рождения и 25 лет со дня смерти Александра Александровича Баева (1904–1994), российского биохимика.

115 лет со дня рождения Глеба Михайловича Франка (1904–1976), российского биофизика.

115 лет со дня рождения Георгия Антоновича Гамова (1904–1968), американского физика, русского по происхождению, эмигрировавшего в 1930-е годы. Автор крупных открытий и гипотез в теоретической физике (туннельный эффект) и астрофизике (теория эволюции звезд с термоядерным источником энергии, теория Большого Взрыва вселенной). Ему же принадлежит идея триплетности генетического кода (обнаружена в 1954 г.).

110 лет со дня рождения Эдварда Л. Тейтема (Edward Lawrie Tatum, 1909–1975), американского молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1958 года, вместе с Джорджем Уэлсом Бидлом и Джошуа Ледербергом.

110 лет со дня рождения Риты Леви-Монтальчини (1909–2012), итальянского нейробиолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1986, совместно со Стенли Коэном) за открытие факторов роста.

105 лет со дня рождения Ренато Дульбекко (1914–2012), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1975, совместно с Х.М. Теминим и

Д. Балтимором) за открытия, касающиеся взаимодействия между вирусами опухолей и генетическим материалом клетки.

90 лет со дня рождения Вернера Арбера (род. в 1929 г.), швейцарского генетика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1978, вместе с Х.О. Смитом и Д. Натансом) за открытие ферментов рестрикции и приложение этих знаний к проблемам молекулярной генетики.

85 лет со дня рождения и 25 лет со дня смерти Хоурда Мартина Темина (1934–1994), американского молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1975, совместно с Р. Дульбекко и Д. Балтимором) за открытия, касающиеся взаимодействия между вирусами опухолей и генетическим материалом клетки.

85 лет со дня рождения Юрия Анатольевича Овчинникова (1934, 2 августа – 1988), российского молекулярного биолога, академика АН СССР, вице-президента АН СССР (1974–1988).

80 лет со дня рождения Сусуму Тонегавы (Susumu Tonegawa, род. в 1939 г.), американского иммуногенетика, японца по происхождению, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1987) за открытие генетического принципа происхождения разнообразия антител.

75 лет со дня рождения Кэри Б. Муллиса (Kary B. Mullis, род. в 1944 г.), американского биохимика, создателя метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), лауреата Нобелевской премии по химии 1993 года (совместно с канадским биохимиком Майклом Смитом).

75 лет со дня рождения Рахима Мусаевича Хайтова (род. в 1944 г.), российского иммунолога.

70 лет со дня смерти Феликса Д'Эрелля (F.H. D'Erelle, 1873–1949), канадского бактериолога, открывшего бактериофаги в 1917 году.

25 лет со дня смерти Дороти Мэри Кроуфут-Ходжкин (1910–1994), английской химика, лауреата Нобелевской премии (1964), иностранного члена АН СССР (1976). Награждена золотой медалью им. М.В. Ломоносова (1982).

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 29.03.19
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 4,0. 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: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru