

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

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

Scientific and practical journal

Founded in 2005

Chief editor

R.G. Vasilov

Editorial board

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

Editorial council

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

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

Head edited by O.V. Colombet

Address: 123060, Moscow, PO Box 3

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

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

Founder and Publisher:

ANO «Information and Analytical Center
medical and social problems»

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

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

E-mail: raifvasilov@mail.ru

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

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Васильев 5

Оригинальные статьи

Разработка технологии изготовления панкреатического гидролизата пекарских дрожжей как основы питательных сред для холерного вибриона.

Д.И. Каминский, А.Б. Мазрухо, Д.В. Соков 6

Быстрое определение таксономического состава пробиотиков методом нанопорового секвенирования.

Е.А. Ермакова, А.С. Благодатский, Д.Д. Козина, Е.С. Жданова, А.М. Ермаков 15

Влияние пищевых волокон на потребительские свойства кисломолочного продукта на козьем молоке.

Г.Е. Рысмухамбетова, К.Е. Белоглазова, Л.В. Карпунина, М.В. Забелина, Т.Б. Ледаев 24

Изучение показателей качества яблочных выжимок.

Б.М. Нурғалиева, К.Е. Белоглазова, Г.Е. Рысмухамбетова, Л.Г. Ловцова 34

Микробиологическая эффективность бытовых фильтров для доочистки питьевой воды.

С.С. Курманова, А.С. Баранова, В.А. Лахно, О.Н. Постникова 43

Влияние структурной организации плуроника F68 на функциональную активность митохондрий печени крысы.

А.П. Кувырченкова, Т.Н. Голева, А.Г. Рогов, М.А. Трунаева, Н.Ю. Лотош, А.А. Селищева 50

Подбор реагентов сублимационной сушки для выявления нуклеиновых кислот вируса гепатита В методом ПЦР.

С.Г. Марданлы, И.И. Ермолаев, И.И. Ильин 60

Противоопухолевые свойства и механизм действия алкил-2-гидроксibenзилдифенилфосфониевых солей.

А.П. Любина, А.Д. Волошина, С.К. Амерханова, А.С. Сапунова, Д.А. Татаринев, В.Ф. Миронов 68

Анализ эффективности используемых в практике питательных сред для выделения, идентификации и дифференциации паразитических вибрионов.

И.К. Савельева, О.С. Чемисова, А.Б. Мазрухо, Г.Д. Харабаджян, М.М. Сагакянц, В.А. Рыкова, О.А. Цырулина, Д.И. Каминский, Д.В. Соков 76

Оптимизация анода микробного биотопливного элемента на основе карбонизированной ткани.

Е.Д. Сизикова, М.В. Вишневская, П.М. Готовцев, В.Г. Сучков, В.А. Ершова, Р.Г. Васильев 85

Обзоры

Влияние соединений теллура на микроорганизмы. Перспективы использования.

А.В. Евтеев, С.О. Водопьянов 91

Правила для авторов 99

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Development of technology for the manufacture of pancreatic hydrolysate of baker's yeast as the basis of nutrient media for cholera vibrio.

D.I. Kaminsky, A.B. Mazrukho, D.V. Sokov..... 6

Rapid determination of the taxonomic composition of probiotics by nanopore sequencing.

E.A. Ermakova, A.S. Blagodatsky, D.D. Kozina, E.S. Zhdanova, A.M. Ermakov..... 15

Dietary fiber influence on the consumer properties of a fermented milk product based on goat's milk.

G.E. Rysmukhambetova, K.E. Beloglazova, L.V. Karpunina, M.V. Zabelina, T.B. Ledyayev..... 24

Study of quality indicators of apple pomace.

B.M. Nurgalieva, K.E. Beloglazova, G.E. Rysmukhambetova, L.G. Lovtsova 34

Microbiological efficiency of household filters for additional purification of drinking water.

S.S. Kurmanova, A.S. Baranova, V.A. Lakhno, O.N. Postnikova 43

Effect of the structural organization of Pluronic F68 on the functional activity of rat liver mitochondria.

*A.P. Kuvyrchenkova, T.N. Goleva, A.G. Rogov, M.A. Trunaeva,
N.Yu. Lotosh, A.A. Selishcheva*..... 50

Freeze drying reagent selection for detection of hepatitis B virus nucleic acids by PCR.

S.G. Mardanly, I.I. Ermolaev, I.I. Ilin 60

Antitumor properties and mechanism of action of alkyl-2-hydroxybenzylidiphenylphosphonium salts.

*A.P. Lyubina, A.D. Voloshina, S.K. Amerkhanova, A.S. Sapunova,
D.A. Tatarinov, V.F. Mironov* 68

Analysis of the effectiveness of nutrient medium used in practice for the isolation, identification and differentiation of parahaemolytic vibrios.

*I.K. Savelyeva, O.S. Chemisova, A.B. Mazrukho, G.D. Kharabajakhyan,
M.M. Sagakyants, V.A. Rykova, O.A. Tsurulina, D.I. Kaminsky, D.V. Sokov*..... 76

Optimization of the anode of a microbial biofuel cell based on carbonized fabric.

*E.D. Sizikova, M.V. Vishnevskaya, P.M. Gotovtsev,
V.G. Suchkov, V.A. Ershova, R.G. Vasilov* 85

Reviews

The effect of tellurium compounds on microorganisms. Prospects of use.

A.V. Evteev, S.O. Vodopyanov 91

Rules for authors 99

К читателям

Настоящий четвертый номер сформирован в основном из оригинальных статей.

В статье Д.И. Каменского с коллегами из Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора представлена технология получения панкреатического гидролизата пекарских дрожжей — новой основы питательных сред для культивирования и выделения холерного вибриона.

В работе сотрудников учреждений из Пушкино и Серпухова (Ермакова Е.А. и др.) был проанализирован состав ряда коммерчески доступных пробиотиков и выполнено сравнение результатов, полученных с помощью секвенирования 16S рРНК (16S), и метагеномных данных с использованием нанопорового секвенирования.

Группа исследователей из Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова (Рысмухамбетова Г.Е. и др.) изучила влияние пищевых волокон на потребительские свойства кисломолочного продукта на козьем молоке.

Другая группа работников из того же института (Нургалиева Б.М. и др.) исследовала качества яблочных выжимок, получаемых в СПССК «Хвалынский сад» (Россия) из яблок сорта «Беркутовское». Показана возможность использования изученного вторичного плодоовощного сырья не только в качестве кормовой базы, но и для конструирования новых продуктов питания.

Коллектив авторов из учреждений Симферополя (Курманова С.С. и др.) осуществил исследование микробиологической эффективности бытовых фильтров для доочистки питьевой воды.

Представители трех учреждений Москвы (Курчатовский институт, МИРЭА-Российский технологический университет, МГУ) — Кувырченкова А.П. с коллегами — изучили методом динамического светорассеяния процесс мицеллообразования плюроники F68 в воде, в фосфатно-солевом буфере и в среде для инкубации митохондрий.

Исследователи из Электрогорска и Орехово-Зуево (Марданлы С.Г. и др.) провели подбор реагентов сублимационной сушки для выявления нуклеиновых кислот вируса гепатита В методом ПЦР.

Любиной А.П. и другими сотрудниками из Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (Казань) были исследованы алкил-2-гидроксibenзилдифенилфосфониевые соли, обладающие двойным — антимикробным и противоопухолевым действием. Эти соединения проявили высокоселективное цитотоксическое действие против раковых клеточных линий промиелоцитарной лейкемии, карциномы предстательной железы и аденокарциномы яичника.

Авторы из Ростовского-на-Дону противочумного института (Савельева И.К. и др.) провели сравнительный анализ эффективности зарегистрированных в качестве изделий медицинского назначения питательных сред отечественного и зарубежного производства для диагностики пищевых токсикоинфекций, вызываемых патогенными для человека вибрионами.

Сизикова Е.Д. вместе с группой авторов из Московского политехнического университета, НИЦ «Курчатовский институт», Московского физико-технического института представили микробный биотопливный элемент на основе электродов из различных видов графитированной ткани.

И, наконец, в номере помещен единственный обзор «Влияние соединений теллура на микроорганизмы. Перспективы использования», подготовленный сотрудниками Ростовского-на-Дону противочумного института А.В. Евтеевым и С.О. Водопьяновым. Обсуждены перспективы дальнейшего использования соединений теллура в качестве селективного фактора.

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

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗАТА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ КАК ОСНОВЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Д.И. КАМИНСКИЙ*, А.Б. МАЗРУХО, Д.В. СОКОВ

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

Разработана технология получения панкреатического гидролизата пекарских дрожжей — новой основы питательных сред для культивирования и выделения холерного вибриона. Полученный белковый гидролизат является доступной и эффективной альтернативой питательным основам из сырья животного происхождения: пептону ферментативному и панкреатическому гидролизату казеина. Сконструированные на основе разработанного препарата «Плотная питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона. Холерная дрожжевая среда агаризованная (ХДС-агар)» и «Бульон для культивирования холерного вибриона (ХДС-бульон)» не уступают используемым в практике средам аналогичного назначения по всем изученным биологическим показателям в отношении различных штаммов *Vibrio cholerae*. Продемонстрирована возможность использования сконструированных сред в мониторинговых исследованиях проб воды на вибриофлору и скрининга штаммов холерного вибриона по критерию энтеротоксин-продуцирующей активности *in vitro*.

Ключевые слова: белковые гидролизаты, питательные среды, холерный вибрион, лабораторная диагностика.

Введение

Завоз холеры на территорию Российской Федерации с угрозой ее распространения является одним из наиболее значимых внешних эпидемиологических рисков в связи с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией по данной опасной инфекционной болезни в мире, существованием эндемичных территорий в ряде стран Африки и Азии и тенденцией роста заболеваемости по полиномиальной линии тренда [9, 10, 11]. В этой связи совершенствование средств и методов лабораторной диагностики холеры рассматривается как одна из наиболее приоритетных задач эпидемиологического надзора. Среди многочисленных средств лабораторной диагностики данной инфекционной болезни роль питательных сред для выделения, культивирования, идентификации и изучения различных свойств холерных вибрионов в современных условиях остается достаточно важной [7, 12].

Дороговизна животных и растительных белков, а также отсутствие широкомасштабного промышленного производства других видов непищевого сырья, пригод-

ных для использования в средоварении, явились предпосылками возвращения интереса ученых к хлебопекарным и пивным дрожжам на основе современных научных представлений и методов. Так, в ряде публикаций [1, 2] отражено применение аутолизатов и экстрактов пекарских дрожжей в качестве стимуляторов роста некоторых микроорганизмов и самостоятельных питательных основ. При изготовлении аутолизатов пекарских дрожжей происходят связанные между собой сложные процессы: аутофагия — деградация внутриклеточного белка, аутолиз и выход за пределы клетки белковых продуктов [13, 15]. Однако аутолизаты и экстракты пекарских дрожжей имеют ряд недостатков, ограничивающих их широкое применение как главных ингредиентов питательных сред. Так, дрожжевые экстракты характеризуются низкими показателями общего и аминокислотного азота, являясь фактически источником витаминов, а не аминокислот и азотсодержащих компонентов. Аутолизаты пекарских дрожжей представляют собой самостоятельные питательные основы с достаточно высоким аминокислотным азотом и богатым аминокислотным составом, но стандартизация их затруднена в связи с неуправляемостью процесса аутолитического гидролиза за счет собственных дрожжевых ферментов — пепсиназы, триптазы и эриптазы, имеющих различную специфичность при взаимодействии с белковой молекулой.

По нашему мнению, представляется целесообразным и перспективным использовать для гидролиза

© 2024 г. Каминский Д.И., Мазрухо А.Б., Соков Д.В.

* Автор для переписки:

Каминский Денис Игоревич

научный сотрудник лаборатории питательных сред отдела диагностических препаратов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: kaminsky_di@antiplague.ru

пекарских дрожжей стандартные ферментные препараты панкреатина крупного рогатого скота, выпускаемые предприятиями мясоперерабатывающей и фармацевтической промышленности, с известной активностью его основных компонентов — трипсина, амилазы и липазы. Очевидные преимущества панкреатического гидролиза пекарских дрожжей — это его управляемость и прогнозируемость, возможность дозирования фермента и оптимизации соотношения фермент-субстрат, мягкость действия панкреатина на белки, что значительно снижает опасность рацемизации аминокислот и образования вторичных продуктов, узкая специфичность действия трипсина (гидролизует только пептидные связи, образованные основными аминокислотами — лизином и аргинином), достаточно глубокое расщепление им дрожжевых белков с образованием низкомолекулярных пептидов и отдельных аминокислот, хорошо усваиваемых микробами при минимальных затратах энергии на мобилизацию клеточных депептидаз, сохранение в гидролизате основных нуклеотидов и витаминов группы В, необходимых для стимуляции роста бактерий.

Низкая себестоимость и стандартность (соответствие ГОСТ Р 54731-2011) исходного сырья — дрожжей хлебопекарных прессованных и панкреатина крупного рогатого скота сухого, достаточное количество отечественных предприятий, выпускающих указанную продукцию, простая технология изготовления панкреатического гидролизата пекарских дрожжей и сред из него, — в перспективе создают предпосылки конкурентоспособности и востребованности данного белкового гидролизата на современном рынке отечественных и импортных микробиологических питательных сред, что особо актуально и в аспекте импортозамещения.

Цель работы: разработка технологии изготовления панкреатического гидролизата пекарских дрожжей и изучение возможности его использования в качестве питательной основы сред для холерного вибриона.

Материалы и методы

В настоящем исследовании были использованы три основных марки дрожжей хлебопекарных прессованных, выпускаемых Ростовским-на-Дону дрожжевым заводом: «Особые», «Градус» и «Хлебное дерево», а также дрожжи хлебопекарные прессованные «Экстра» производства ООО «Воронежские дрожжи», дрожжи Черкесского и Санкт-Петербургского дрожжевых заводов. Аналогичную продукцию выпускает ряд других предприятий в разных регионах России.

Перед проведением гидролиза дрожжи хлебопекарные прессованные измельчали механическим путем и добавляли к ним дистиллированную воду, обеспечивая оптимальную для ферментативного гидролиза плотность суспензии. Поиск оптимума плотности суспензии дрожжей для проведения гидролиза был направлен на нахождение баланса между скоростью гидролиза, итоговым показателем аминного азота в конечном продукте и расчётным выходом из полученного количества гидролизата агаризованной и жидкой сред.

В качестве гидролизующего фермента в работе был использован панкреатин крупного рогатого скота сухой (ОСТ 49167-92) производства ООО «Мясокомбинат Ростовский», г. Ростов-на-Дону. Активность 1 мг данного препарата эквивалентна: по липазе — 25 F.I.P. (единиц Международной Фармацевтической Федерации); по амилазе — 19,3 F.I.P.; по протеазе — 1,3 F.I.P. Исследовали дозы панкреатина крупного рогатого скота сухого (в пересчёте на 1 кг дрожжей) в диапазоне от 0,1 до 1,0 г/кг дрожжей с шагом 0,1 г/кг. Критериями оценки эффективности использования указанного ферментного препарата в исследованных дозах являлись: длительность гидролиза, содержание аминного азота в полученных панкреатических гидролизатах, осветляемость полученных гидролизатов, биологические показатели агаризованных питательных сред, приготовленных из данных панкреатических переваров, в отношении тест-штаммов *V. cholerae*.

Были использованы следующие методы ингибирования собственных дрожжевых ферментов на стадии изготовления суспензии пекарских дрожжей: щелочения суспензии с помощью 20%-ного раствора гидроксида натрия до значений pH свыше 8,0, обеспечивающих оптимальную протео-, амило- и липолитическую активность вносимого в неё панкреатина и угнетающих деятельность всех трёх дрожжевых ферментов, в том числе, и эриптазы, оптимум активности которой приходится на слабощелочной pH (7,4–7,6); предварительного прогревания изготовленной суспензии на водяной бане при 56 °С в течение 30 минут; кипячения суспензии в течение 18–20 минут; сочетания прогревания суспензии с последующим щелочением и кипячения со щелочением.

Для нахождения оптимальной температуры проведения панкреатического гидролиза пекарских дрожжей нами было исследовано влияние на указанный процесс температур в диапазоне от 30 до 55 °С.

Эффективность проводимого гидролиза оценивали по скорости нарастания аминного азота. Данный показатель определяли методом формолового титрования в соответствии с МУК 4.2.2316-08 [6].

Полученный белковый гидролизат характеризовали по физико-химическим показателям общего и аминного азота, содержанию углеводов, хлоридов, нуклеиновых кислот, свободного триптофана [5, 6, 8].

Сравнительное изучение полученного панкреатического гидролизата пекарских дрожжей и других широко используемых в качестве основ питательных сред для холерного вибриона белковых гидролизатов: пептона ферментативного и панкреатического гидролизата казеина проводили следующим методом. Каждый из тестируемых белковых гидролизатов был введен в состав вариантов агаризованной питательной среды в различных концентрациях от 0,015 до 0,1% по аминному азоту с шагом в 0,005%. Полное соответствие варианта среды требованиям МУ 3.3.2.2124-06 [3] по всем оцениваемым биологическим показателям (чувствительности, показателю прорастания, диаметру и морфологии колоний) в отношении тест-штаммов холерного вибриона (*V. cholerae* O1 classical P-1 (145), *V. cholerae* O1 El Tor M-878, *V. cholerae* non O1/non O139 P-9741) рассматривали как «положительный отклик». Совокупность значений концентрации гидролизата в составе варианта среды, при которых регистрировали «положительный отклик», обозначали как «диапазон концентраций, обеспечивающий положительный отклик».

Оценку перспектив полученного белкового гидролизата в качестве основы питательных сред для холерного вибриона проводили с использованием сконструированной «Плотной питательной среды для выделения и культивирования холерного вибриона. Холерной дрожжевой среды агаризованной (ХДС-агар)», имеющей в составе:

- панкреатический гидролизат пекарских дрожжей — 0,05% (по аминному азоту);
- натрий хлористый — 4,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный — 6,0 г;
- агар-агар микробиологический — 12,0 г;
- вода дистиллированная — до 1,0 л;
- pH готовой среды — $7,8 \pm 0,2$.

Тестирование указанной среды проводили по следующим биологическим показателям: чувствительности, показателю прорастания, диаметру и морфологии колоний с использованием штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп.

Изучение возможности использования полученного панкреатического гидролизата пекарских дрожжей как основы сред, обеспечивающих продукцию холерного энтеротоксина (СТ) штаммами *V. cholerae in vitro*, проводили с использованием опытной среды ХДС-бульон следующего состава:

- панкреатический гидролизат пекарских дрожжей — из расчёта 0,07% по аминному азоту;
- натрий хлористый — 5,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный — 6,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная — до 1,0 л;
- pH среды $7,8 \pm 0,2$.

В качестве контрольной питательной среды в данной серии экспериментов был использован бульон Мартена pH $7,7 \pm 0,1$.

Оценку энтеротоксин-продуцирующей активности штаммов холерного вибриона на опытной и контрольных питательных средах проводили титрованием в культуре клеток СНО-К1 [14].

При статистической обработке данных математический анализ включал в себя вычисление средних величин, ошибок средних арифметических, коэффициентов вариаций, доверительных интервалов, t-критерия Стьюдента. Группировку первичных данных и вычисления проводили на персональных компьютерах с использованием пакета программ Excel 7.0.

Результаты и обсуждение

Анализ кривых гидролиза дрожжей выявил, что характерная константа нарастания скорости (по аминному азоту) на протяжении первых восьми часов была при использовании марки «Особые» (рис. 1). У других дрожжей имело место отставание, связанное с ригидностью клеточных стенок.

Оптимальной плотностью суспензии прессованных хлебопекарных дрожжей в дистиллированной воде, установленной в ходе серии экспериментов, явилось значение 0,2 кг дрожжей / 1 кг суспензии (эквивалентное 1 кг дрожжей на 4 л воды). При данной плотности регистрируется наименьшая длительность гидролиза и наилучшие расчётные показатели выхода агаризованной и жидкой питательных сред из полученного количества гидролизата.

Необходимость предварительного ингибирования собственных дрожжевых ферментов в суспензии пекарских дрожжей до момента внесения внешнего фермента — панкреатина диктуется возможностью параллельного протекания в гидролизуемой смеси панкреатического переваривания субстрата и его аутолиза, что делает данный технологический процесс практически неуправляемым и приводит к появлению несбалансированного по пептидному составу конечного продукта, ухудшающего основные биологические показатели изготовленных из него питательных сред.

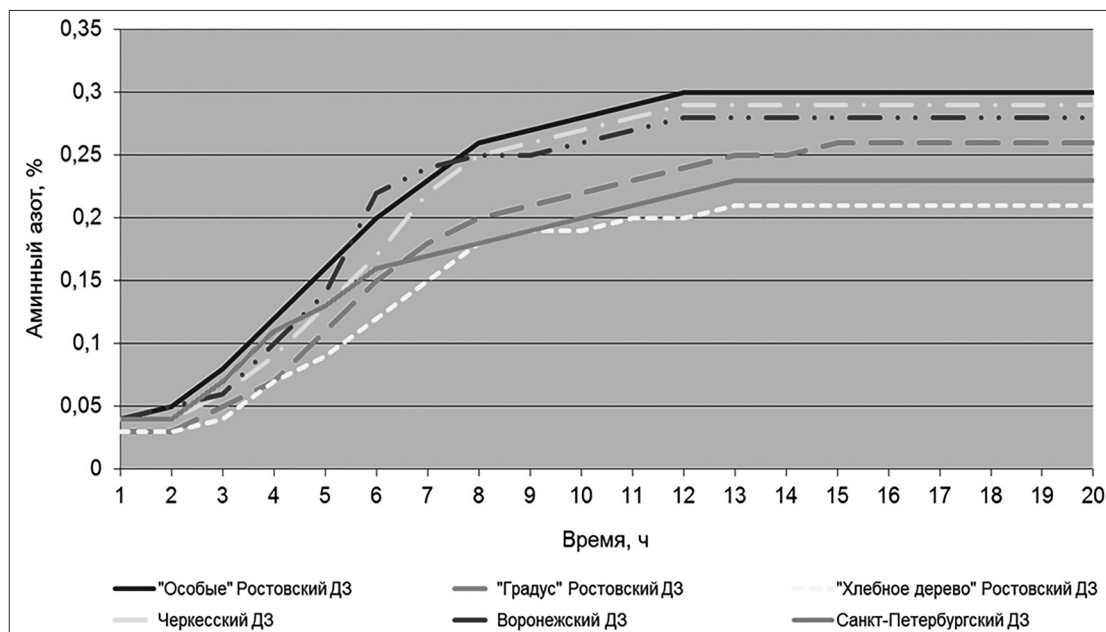


Рис. 1. Кривые нарастания аминного азота при гидролизе хлебопекарных дрожжей различных марок и производителей

Полученные результаты демонстрируют преимущество метода предварительного щелочения суспензии до значения рН 8,1–8,5. Однако, поскольку оптимальным для действия трипсина был рН 8,2, мы предпочли периодическую коррекцию этого показателя 20%-ным раствором гидроокиси натрия.

Наилучшие результаты гидролиза и характеристики полученных панкреатических переваров были достигнуты при использовании панкреатина крупного рогатого скота сухого в дозах от 0,7 до 1,0 г/кг дрожжей с практически идентичными значениями всех оцененных показателей для каждой из доз данного диапазона. За оптимальную дозу фермента для обеспечения процесса панкреатического гидролиза прессованных пекарских дрожжей была принята минимальная из четырёх доз указанного диапазона, то есть 0,7 г/кг дрожжей. Использование более низких доз панкреатина не обеспечивает полноты расщепления субстрата, создаёт трудности при пассивном осветлении полученного в процессе гидролиза конечного продукта.

Так как в первые шесть часов скорость реакции наиболее высокая, а буферность гидролизуемой смеси низкая (в связи с тем, что в ней присутствуют преимущественно белки и высокополимерные пептиды, а не свободные аминокислоты и олигомерные пептиды, образующиеся при гидролизе белков и полипептидов), коррекцию рН необходимо проводить с интервалом в 20 минут. В последующем этот интервал увеличивается до 1 часа (6-й – 12-й час реакции); 12 часов (12-й – 48-й час реакции); 24 часов (от 48-го часа до окончания гидролиза).

Было установлено, что оптимальным значением рН панкреатического гидролиза суспензии прессованных пекарских дрожжей следует считать значение 8,3, потому что именно при этих условиях регистрируется наиболее высокая скорость гидролиза и наилучшие качества конечного продукта.

Наименьшая длительность процесса панкреатического гидролиза дрожжей хлебопекарных прессованных, а также наиболее высокое содержание аминного азота в конечном продукте и лучшие биологические показатели приготовленных из него агаризованных питательных сред в отношении тест-штаммов холерного вибриона были зарегистрированы при температуре гидролизуемой суспензии дрожжей 45 °С.

Конечным этапом технологического процесса получения панкреатического перевара пекарских дрожжей явилось осветление. В практике выполнения данной работы сравнивали метод центрифугирования (как наиболее быстрый) и отстаивания (как наименее затратный). Полученные результаты позволяют отдать приоритет методу осветления гидролизата путём отстаивания на холоду, несмотря на его значительную длительность, поскольку он позволяет получить продукт, не образующий осадка при автоклавировании и приготовлении питательных сред, а также обеспечивает более высокие значения биологических показателей агаризованных питательных сред на его основе.

Результаты оптимизации технологического процесса изготовления панкреатического гидролизата пекарских дрожжей представлены в таблице 1.

**Оптимальные параметры технологического процесса изготовления
панкреатического гидролизата пекарских дрожжей**

| Наименование параметра | Оптимум |
|---|--|
| Марка прессованных пекарских дрожжей | Дрожжи «Особые» Ростовского дрожжевого завода; дрожжи Черкесского дрожжевого завода |
| Плотность суспензии прессованных пекарских дрожжей в воде очищенной | 0,2 кг дрожжей / 1 кг суспензии (эквивалентная 1 кг дрожжей на 4 л воды очищенной) |
| Стабилизатор | Хлороформ в насыщающих концентрациях |
| Метод ингибирования собственных дрожжевых ферментов | Щелочение до рН выше 8,0 с помощью 20%-ного раствора гидроокиси натрия |
| Ферментный препарат | Панкреатин крупного рогатого скота сухой ОСТ 49167-92 |
| Доза ферментного препарата | 0,7 г / кг дрожжей |
| рН гидролиза | 8,3±0,2 |
| Температура гидролиза | 45±1 °С |
| Длительность гидролиза | 16,5±1,5 ч |
| Метод осветления гидролизата | Отстаивание на холоде при температуре 5±3 °С с последующей декантацией |
| Метод стерилизации | Автоклавирование при 110 °С 20 минут |

Полученный указанным способом панкреатический гидролизат пекарских дрожжей характеризуется следующими физико-химическими показателями:

- прозрачность и цветность — препарат должен быть прозрачным, коричневого или светло-коричневого цвета;
- рН — 8,2±0,3;
- аминный азот — 0,285±0,065%;
- общий азот — 0,93±0,21%;
- содержание хлорида натрия — 0,46±0,14%;
- углеводы — 0,04 ±0,015%;
- свободный триптофан — 0,107±0,004%;
- нуклеиновые кислоты — 0,002±0,00005%.

По результатам сравнительного изучения разработанного панкреатического гидролизата пекарских дрожжей, пептона ферментативного и панкреатического гидролизата казеина в составе вариантов агаризованной питательной среды по биологическим показателям в отношении тест-штаммов холерного вибриона было установлено, что наиболее широкий «диапазон концентраций, обеспечивающий позитивный отклик», был зарегистрирован при использовании панкреатического гидролизата пекарских дрожжей — 12 исследованных значений концентрации гидролизата обеспечивали соот-

ветствие вариантов среды требованиям МУ 3.3.2.2124-06. В случае применения пептона ферментативного и панкреатического гидролизата казеина «позитивный отклик» был зарегистрирован в более узких диапазонах концентраций — пять и два значения соответственно.

На основе полученного панкреатического гидролизата пекарских дрожжей была сконструирована «Плотная питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона. Холерная дрожжевая среда агаризованная (ХДС-агар)».

Проведены сравнительные испытания сконструированной среды и контрольной среды, приготовленной из зарегистрированного в установленном порядке «Агара щелочного сухого» производства ФБУН ГНЦ ПМБ, пос. Оболенск с использованием 28 штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп. По результатам проведенных испытаний сконструированная среда полностью соответствовала требованиям МУ 3.3.2.2124-06 [3] и не уступала контрольной по всем изученным показателям (табл. 2). Колонии штаммов *V. cholerae* на опытной среде имели типичную для вибрионов морфологию. Радиальная скорость роста колоний на сконструированной питательной среде соответствовала аналогичному показателю на контрольной среде.

**Сравнительное изучение разработанной и контрольной питательных сред
с использованием различных штаммов холерного вибриона**

| Группа штаммов | Чувствительность, м.к. (M±m) | | Показатель прорастания, % (M±m) | | Диаметр колоний, мм (M±m) | |
|--|---------------------------------|----------|------------------------------------|----------|------------------------------|---------|
| | O1 | K2 | O | K | O | K |
| <i>V. cholerae classical</i> O1 4 штамма | 10,0±0,0 | 10,0±0,0 | 36,5±1,6 | 30,6±1,8 | 2,2±0,2 | 1,9±0,1 |
| <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 11 штаммов | 10,0±0,0 | 10,0±0,0 | 36,3±3,4 | 31,2±2,9 | 2,8±0,3 | 1,8±0,1 |
| <i>V. cholerae</i> O139 8 штаммов | 10,0±0,0 | 10,0±0,0 | 39,6±2,5 | 34,9±1,3 | 2,4±0,2 | 2,0±0,1 |
| <i>V. cholerae</i> non O1/ non O139 5 штаммов | 10,0±0,0 | 10,0±0,0 | 36,1±3,4 | 34,3±2,8 | 2,4±0,3 | 2,1±0,2 |

Примечания: O1 — опытная среда ХДС-агар; K2 — контрольная среда Агар щелочной сухой производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск

При исследовании 29 штаммов холерного вибриона, выделенных от людей во время вспышки холеры в г. Казани летом 2001 г., и трех токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, изолированных из воды поверхностных водоемов и стоков на территории г. Ростова-на-Дону в 2000–2001 гг., было установлено, что все взятые в исследование штаммы продуцировали СТ *in vitro*, наличие которого регистрировали в культуре клеток СНО-K1 при их культивировании как в сконструированном на основе панкреатического гидролизата пекарских дрожжей ХДС-бульоне, так и в контрольной среде — бульоне Мартена.

Следует также отметить эффективность сконструированных на основе панкреатического гидролизата пекарских дрожжей агаризованной и жидкой накопительной питательных сред для выделения холерного вибриона в ходе мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов и стоков на вибриофлору. За шесть лет апробации данных сред с их помощью были изолированы 18 культур *V. cholerae* O1 (16 — из воды поверхностных водоемов, две — из сточных вод) на территории г. Ростова-на-Дону.

Заключение

Таким образом, разработанная технология позволила получить белковый гидролизат, который может быть успешно использован в качестве доступной отечественной питательной основы сред для выделения и культивирования холерного вибриона. Способ изготовления панкреатического гидролизата пекарских дрожжей защищен патен-

том на изобретение Российской Федерации [3], а сконструированная на его основе «Плотная питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона. Холерная дрожжевая среда агаризованная (ХДС-агар)» зарегистрирована в установленном порядке как изделие медицинского назначения, разрешенное к применению на территории Российской Федерации (регистрационное удостоверение РЗН 2017/5435 от 27.03.2017 г.).

Выводы по результатам осуществленных работ:

1. Разработан оригинальный способ получения новой питательной основы сред для холерного вибриона — панкреатического гидролизата пекарских дрожжей, приоритетность которого подтверждена патентом на изобретение.

2. Панкреатический гидролизат пекарских дрожжей является адекватной альтернативой традиционным мясным и казеиновым белковым гидролизатам, способной обеспечить питательные потребности различных штаммов холерного вибриона.

3. Сконструированная на основе панкреатического гидролизата пекарских дрожжей «Плотная питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона. Холерная дрожжевая среда агаризованная (ХДС-агар)» полностью соответствует требованиям МУ 3.3.2.2124-06 и не уступает контрольной среде — «Агару щелочному сухому» — по всем изученным биологическим показателям.

4. Сконструированная на основе панкреатического гидролизата пекарских дрожжей питательная среда ХДС-бульон обеспечивает продукцию холерного энтеротоксина

in vitro штаммами *V. cholerae* O1 El Tor, соизмеримую с таковой на контрольной среде — бульоне Мартена.

5. Продемонстрирована эффективность сред, сконструированных на основе панкреатического гидролизата пекарских дрожжей, при их использовании в мониторинговых исследованиях проб воды на наличие холерного вибриона.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Внешнее финансирование. Исследование проведено без внешнего финансирования.

Литература

1. Антонычева М.В., Кузьмиченко И.А., Никифоров А.К., Волох О.А., Шульгина И.В. Эффективность автолиза пекарских дрожжей, индуцированного ферментными препаратами // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 3(101). — С. 62–65.
2. Базлов Г.В., Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Антонычева М.В., Белоусов А.Д. Совершенствование технологии получения экстракта автолизата пекарских дрожжей // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. — 2012. — № 1. — С. 11–14.
3. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллёза, легионеллёза: МУ 3.3.2.2124-06 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 17.08.2006). — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. — 22 с.
4. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Алутин И.М., Рожков К.К. Способ получения белкового гидролизата. Патент РФ № 2375441, опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.
5. Медицинские иммунобиологические препараты. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: МУК 4.1/4.2.5888-96 (утверждены заместителем Главного санитарного врача Российской Федерации 31.10.1996). — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 1996. — 79 с.
6. Методы контроля бактериологических питательных сред: МУК 4.2.2316-08 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 18.01.2008) — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 52 с.
7. Методы лабораторной диагностики холеры. Методические указания. МУК 4.2.3745-22. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. — 78 с.
8. Микробиологические методы исследования при инфекционных заболеваниях. Под ред. Синая Г.Я., Биргера М.О. Изд-е 2-е, перераб. и доп. — М.: Медгиз, 1949. — 648 с.
9. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Миронова Л.В., Монахова Е.В., Соболева Е.Г., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Меньшикова Е.А., Подойницына О.А., Ежова М.И., Евтеев А.В. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2023. — № 1. — С. 56–66.
10. Попова А.Ю., Носков А.К., Ежлова Е.Б. и др. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2024. — № 1. — С. 76–88.
11. Хунхеева Ж.Ю., Миронова Л.В., Селезнев В.А. и др. Анализ внешних рисков завоза холеры на территорию Приморского края различными видами транспорта // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. — 2021. — № 20(5). — С. 61–68.
12. Шепелин А.П. Современное состояние и направления развития производства питательных сред в России // Современная лабораторная диагностика. — 2015. — № 2(16). — С. 18–20.
13. Gèlinas P. Inventionals on Baker's yeast strains and speciality ingredients recent patents on food // Nutritional Agriculture. — 2009. — Vol. 1. — No. 2. — P. 104–132.
14. Guerrant R.L. Cyclic adenosine monophosphate and alternation of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* // Infect. Immun. — 1974. — Vol. 10. — P. 320–327.
15. Orozco H., Matallana E., Aranda A. Oxidative stress tolerance, adenilate cyclase, and autophagia are key players in the chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* during Winemaking // Appl. Environ. Microbiol. — 2012. — Vol. 78. — No. 8. — P. 2748–2757.

References

1. Antonycheva MV, Kuz'michenko IA, Nikiforov AK, Volokh OA, Shul'gina IV. Effektivnost' avtoliza pekarskikh drozhzhey, indutsirovannogo fermentnymi preparatami. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2009; 3(101):62–65 (in Russian).
2. Bazlov GV, Komissarov AB, Nikiforov AK, Antonycheva MV, Belousov AD. Sovershenstvovaniye tekhnologii polucheniya ekstrakta avtolizata pekarskikh drozhzhey. Vestnik Saratovskogo gosagrouniversiteta im NI Vavilova 2012; 1:11–14 (in Russian).
3. Kontrol' diagnosticheskikh pitatel'nykh sred po biologicheskim pokazatelyam dlya vzbuditeley chумы, kholery, sibirskoy yazvy, tulyareмии, brutselloza, legionelloza: MU 3.3.2.2124-06 (utverzhdены Glavnym sanitarnym vrachom Rossiyskoy Federatsii 17.08.2006). Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2006: 22 (in Russian).

4. Mazrukho AB, Kaminskiy DI, Alutin IM, Rozhkov KK. Sposob polucheniya belkovogo gidrolizata. Patent RF № 2375441, opubl 10.12.2009. Byul № 34 (in Russian).
5. Meditsinskiye immunobiologicheskiye preparaty. Metody kontrolya meditsinskikh immunobiologicheskikh preparatov, vvodimyykh lyudyam: MUK 4.1/4.2.5888-96 (utverzhdeny zamestitelem Glavnogo sanitarnogo vracha Rossiyskoy Federatsii 31.10.1996). Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 1996: 79 (in Russian).
6. Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred: MUK 4.2.2316–08 (utverzhdeny Glavnym sanitarnym vrachom Rossiyskoy Federatsii 18.01.2008) Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2008: 52 (in Russian).
7. Metody laboratornoy diagnostiki kholery. Metodicheskiye ukazaniya. MUK 4.2.3745-22. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2022: 78 (in Russian).
8. Mikrobiologicheskiye metody issledovaniya pri infektsionnykh zbolevaniyakh. Pod red Sinaya GYa, Birgera MO. Izd-ye 2-ye, pererab. i dop. Moscow: Medgiz, 1949: 648 (in Russian).
9. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Mironova LV, Monakhova EV, Soboleva EG, Chemisova OS, Vodopyanov AS, Lopatin A A, Ivanova SM, Menshikova EA, Podoynit-syna OA, Ezhova MI, Evteev AV. Kholera: analiz i otsenka epidemiologicheskoy obstanovki v mire i Rossii. Prognoz na 2023 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2023; 1:56–66 (in Russian).
10. Popova AYu, Noskov AK, Yezhlova YeB i dr. Epidemiologicheskaya situatsiya po kholere v Rossiyskoy Federatsii v 2023 g. i prognoz na 2024 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2024; 1:76–88 (in Russian).
11. Khunkheyeva ZhYu, Mironova LV, Seleznev VA i dr. Analiz vneshnikh riskov zavoza kholery na territoriyu Primorskogo kraya razlichnymi vidami transporta. Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika 2021; 20(5):61–68 (in Russian).
12. Shepelin AP. Sovremennoye sostoyaniye i napravleniya razvitiya proizvodstva pitatel'nykh sred v Rossii. Sovremennaya laboratornaya diagnostika 2015; 2(16):18–20 (in Russian).
13. Gèlinas P. Inventionals on Baker's yeast strains and speciality ingredients recent patents on food. Nutritional Agriculture 2009; 1(2):104–132.
14. Guerrant RL. Cyclic adenosine monophosphate and alternation of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Infect Immun 1974; 10:320–327.
15. Orozco H, Matallana E, Aranda A. Oxidative stress tolerance, adenilate cyclase, and autophagia are key players in the chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* during Winemaking. Appl Environ Microbiol 2012; 78(8):2748–2757.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR THE MANUFACTURE OF PANCREATIC HYDROLYSATE OF BAKER'S YEAST AS THE BASIS OF NUTRIENT MEDIA FOR CHOLERA VIBRIO

D.I. KAMINSKY, A.B. MAZRUKHO, D.V. SOKOV

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

The technology of obtaining pancreatic hydrolysate of baker's yeast, a new basis of nutrient media for cultivation and isolation of cholera vibrio, has been developed. The obtained protein hydrolysate is an affordable and effective alternative to nutrient bases from raw materials of animal origin: fermentative peptone and pancreatic hydrolysate of casein. Constructed on the basis of the developed preparation «Dense nutrient medium for isolation and cultivation of cholera vibrio. Cholera yeast agarized medium (CYM-agar)» and «Broth for cultivation of cholera vibrio (CYM-bouillon)» are not inferior to the media of similar purpose used in practice in all studied biological parameters in relation to different strains of *Vibrio cholerae*. The possibility of using the designed media in monitoring studies of water samples for Vibrioflora and screening of *Vibrio cholerae* strains by the criterion of enterotoxin-producing activity *in vitro* has been demonstrated.

Keywords: protein hydrolysates, nutrient media, cholera vibrio, laboratory diagnostics.

Address:

Kaminsky D.I.

researcher of the laboratory of nutrient media of the department of diagnostic preparations, Federal State Institution of Healthcare Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: kaminsky_di@antiplague.ru

Для цитирования:

Каминский Д.И., Мазрухо А.Б., Соков Д.В. Разработка технологии изготовления панкреатического гидролизата пекарских дрожжей как основы питательных сред для холерного вибриона. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):6–14.

For citation:

Kaminsky D.I., Mazrukho A.B., Sokov D.V. Development of technology for the manufacture of pancreatic hydrolysate of baker's yeast as the basis of nutrient media for cholera vibrio. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4):6–14 (in Russian).

БЫСТРОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПРОБИОТИКОВ МЕТОДОМ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Е.А. ЕРМАКОВА¹, А.С. БЛАГОДАТСКИЙ¹, Д.Д. КОЗИНА^{1,2},
Е.С. ЖДАНОВА¹, А.М. ЕРМАКОВ^{1,2*}

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., г. Пущино;

² ООО «Нанопорус», Московская обл., г. Серпухов

Рынок применения пробиотиков в качестве биологически активных добавок для улучшения здоровья обширен и продолжает расширяться. Однако контроль качества большинства доступных продуктов в этой области проводится с использованием методов низкого разрешения, что может приводить к неправильной идентификации и некорректному отображению их состава. В настоящей работе мы провели анализ состава ряда коммерчески доступных пробиотиков и сравнили результаты, полученные с помощью секвенирования 16S рРНК (16S), и метагеномных данных с использованием нанопорового секвенирования. Наши результаты показали, что данные нанопорового секвенирования ампликонов 16S и метагеномного анализа имеют большой потенциал для обеспечения разрешения на уровне видов для прокариот при анализе коммерческих пробиотиков.

Ключевые слова: пробиотики, таксономический состав, метод нанопорового секвенирования.

Введение

Пробиотики — это живые культуры микроорганизмов, которые приносят пользу здоровью хозяина, восстанавливая баланс кишечной микрофлоры и улучшая иммунную систему, и в основном предназначены для поддержания здоровья человека [15]. Помимо здоровья человека, использование пробиотиков, таких как *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Saccharomyces*, для укрепления здоровья животных и улучшения показателей роста привлекает все большее внимание, поскольку это может уменьшить необходимость использования антибиотиков в животноводстве [3, 15]. Использование микроорганизмов в качестве биологически активных добавок в медицине и биотехнологии, требует указания конкретной информации о пробиотиках, включая таксономическую информацию, чувствительность к противомикробным препаратам и их производство, а также токсигенность и патогенность штамма. На этикетке пробиотического продукта также необходимо указать количество, пользу и срок годности [8]. Поскольку известно, что безопасность и польза микробов зависят от штамма, точная идентификация и

маркировка имеют решающее значение для обеспечения безопасности и эффективности пробиотического продукта и завоевания доверия потребителей. Широко продемонстрированы расхождения в маркировке пробиотических продуктов из-за отсутствия перечисленных таксонов или наличия неперечисленных таксонов. Исследование 55 европейских пробиотических продуктов показало, что до 40–47% пробиотических продуктов были неправильно маркированы [17]. Кроме того, было найдено, что многие пробиотические продукты содержат не указанные в их составе, потенциально патогенные бактерии, которые могут повлиять на безопасность или на качество продукта [4, 7]. Часто сообщалось о ненадлежащей маркировке пробиотических продуктов, такой как неправильное наименование компонентов, устаревшая или неактуальная номенклатура, отсутствие указания количества живых клеток и в некоторых случаях невозможность получения какой-либо живой культуры [4, 19, 20]. Большинство подобных исследований использовало традиционные подходы, то есть селективные методы культивирования, физиологию, биохимию, идентификацию ПЦР, или устаревшие базы данных для идентификации бактерий, что отнимает много времени, накладывает ограничения на конкретные виды микроорганизмов в смешанном многовидовом продукте и приводит к неправильной идентификации компонентов пробиотика. В последнее время высокопроизводительное секвенирование нового поколения является актуальной тенденцией, которая позволяет точно оценить микробный состав и любые потенциально патогенные бактерии,

© 2024 г. Ермакова Е.А., Благодатский А.С., Козина Д.Д., Жданова Е.С., Ермаков А.М.

* Автор для переписки:

Ермаков Артем Михайлович

в.н.с., к.б.н., зав. лабораторией исследований генома, ИТЭБ РАН, главный специалист ООО «Нанопорус»

E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

обнаруженные в пробиотических продуктах. Например, полногеномное секвенирование, микробиомный и метагеномный анализ с использованием секвенирования с короткими прочтениями уже были использованы для проверки микробного состава и возможного загрязнения коммерческих пробиотических продуктов, продаваемых на рынках Канады, Китая и США [16, 18].

Учитывая, что вышеупомянутые подходы не позволяют немедленно идентифицировать видовой состав в смешанном микробном сообществе, для проверки присутствия определенных организмов требуется золотой стандарт ПЦР с использованием штамм-специфичных праймеров. Недавно были проведены исследования по метагеномному анализу состава пробиотиков при помощи методов секвенирования нового поколения с короткими прочтениями как посредством целенаправленного частичного секвенирования 16S рРНК (V3-V4) [13], так и с помощью метагеномного секвенирования методом дробовика (англ. shotgun sequencing) [12]. Методы секвенирования с короткими прочтениями обычно дают возможность определять микроорганизмы на уровне семейства или рода; поэтому больший интерес для оценки качества пробиотических продуктов представляют методы, позволяющие делать это на уровне штамма [9]. К таковым относится нанопоровое секвенирование, которое позволяет работать с единичными молекулами, в режиме реального времени и с небольшим количеством портативного оборудования, что повышает его потенциал в качестве инструмента для полевых исследований [11]. Поскольку данный метод открывает возможность получать очень длинные прочтения, он способен помочь однозначно расшифровать сложные структурные варианты и повторяющиеся области в бактериальных геномах и обеспечить картирование генов устойчивости к противомикробным препаратам на мобильных генетических элементах или плаزمидях [2].

В настоящее время распознавание оснований при нанопоровом секвенировании улучшено при помощи новых реагентов и алгоритмов до >99% (<https://nanoporetech.com/accuracy>). Таким образом, данные длинных считываний могут повысить точность микробной классификации как для всего гена 16S рРНК, так и для образцов метагенома с бактериальными смесями, что уже было продемонстрировано в ряде микробиомных исследований [10, 14], в том числе и на пробиотиках [5, 14].

В настоящем исследовании мы провели анализ состава ряда отечественных пробиотиков при помощи нанопорового секвенирования как 16S рРНК, так и метагенома на отечественном секвенаторе «Нанопорус».

Материалы и методы

Выделение ДНК из образцов пробиотиков

ДНК из образцов пробиотиков выделяли с помощью набора D-Cells (Биолабмикс, Россия). Для этого брали порядка 20 мг сухого образца, растворяли в 150 мкл PBS. Далее выделение ДНК проводили согласно прилагаемому протоколу для выделения ДНК из бактерий. Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью прибора Qubit 4 (Thermo FS, США) и набора QuDye HS (Люмипроб, Россия) и определяли ее качество с помощью горизонтального агарозного гелеэлектрофореза (концентрация агарозы 1,5%).

Аmplification фрагмента гена рибосомальной РНК

Для амплификации фрагмента гена 16S рибосомальной РНК бактерий были выбраны универсальные праймеры, фланкирующие этот ген с участка V1 до участка V9 [6]. Каждый праймер помимо геноспецифической последовательности фланкировался универсальной последовательностью для проведения второго раунда ПЦР с баркодами для обеспечения мультиплексирования библиотеки для секвенирования. Баркоды имели стандартные последовательности, согласно документации Oxford Nanopore (Англия).

Таблица 1

Последовательности праймеров для амплификации генов 16S рибосомальной РНК бактерий

| Праймер | Последовательность |
|---------|--|
| 16S-Fw | 5' TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' |
| 16S-R | 5' ACTTGCCTGTCCGTCTATCTTCGGT TACCTTGTTACGACTT 3' |

Для амплификации использовали набор Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия). ПЦР смесь готовили согласно стандартному протоколу, финальная концентрация каждого праймера составляла 500 нМ. Для каждой реакции использовали ДНК в количестве 10–20 нг. Реакцию проводили по схеме: 95 °С – 1 мин, далее 30 циклов 95 °С – 15 сек, 55 °С – 30 сек и 72 °С – 1 мин 30 сек, далее финальная элонгация 72 °С – 6 мин. Полученные ампликоны очищали с помощью набора Cleanip S-Cap (Евроген, Россия) согласно прилагаемому протоколу. После очистки измеряли концентрацию ампликонов с помощью прибора Qubit 4 (Thermo FS, США) и набора QuDye HS (Люмипроб, Россия) и определяли

их качество с помощью горизонтального агарозного гель-электрофореза (концентрация агарозы 1,5%).

Очищенные ампликоны (100 нг) использовали в качестве матрицы для второго раунда амплификации. Реакцию проводили с помощью набора Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия). ПЦР смесь готовили согласно стандартному протоколу, финальная концентрация каждого праймера для баркодирования составляла 300 нМ. Реакцию проводили по схеме: 95 °С – 1 мин, далее 8 циклов 95 °С – 15 сек, 62 °С – 30 сек и 72 °С – 4 мин, далее финальная элонгация 72 °С – 6 мин.

Продукты реакции проверяли с помощью агарозного гель-электрофореза (1,5%), далее их очищали и измеряли концентрацию как было описано выше. Очищенные ампликоны каждого образца смешивали в количестве 50 нг каждого, полученную смесь использовали в качестве библиотеки для секвенирования.

Подготовка библиотек ДНК для нанопорового секвенирования

Библиотеку для секвенирования на основе смеси полученных после индексирования ампликонов 16S гена рибосомальной РНК готовили с помощью набора Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK114, Oxford Nanopore Technologies, UK) согласно прилагаемым протоколам. Для загрузки в ячейку использовали 100 нг ДНК библиотеки. На всех промежуточных этапах подготовки библиотеки ДНК осуществляли контроль количества и качества ДНК путем измерения концентрации (на приборе Qubit 4 – Thermo FS, США) с помощью набора Qubit HS (Люмипроб, Россия), а также с помощью гель-электрофореза в агарозном 1,5% геле.

Библиотеку для секвенирования метагенома образцов готовили с использованием набора SQK-NBD114.96 (Oxford Nanopore, Англия) согласно прилагаемым протоколам. Для приготовления библиотеки использовали порядка 400 нг ДНК из каждого анализируемого образца. Для загрузки на ячейку использовали 300 нг библиотеки ДНК. На всех промежуточных этапах подготовки библиотеки ДНК осуществляли контроль количества и качества ДНК путем измерения концентрации (на приборе Qubit 4 – Thermo FS, США) с помощью набора Qubit HS (Люмипроб, Россия), а также с помощью гель-электрофореза в агарозном 1,5% геле.

Подготовленные библиотеки ДНК секвенировали с помощью нанопорового секвенатора «Нанопорус» (ООО Нанопорус, Россия) с ячейкой FLO-MIN114 использованием базового программного обеспечения MinKNOW (Oxford Nanopore, Англия). Использовали 100 нг библиотеки ДНК, полученную смешиванием

баркодированных библиотек для мультиплексирования реакции. Бейзколлинг и демультиплексирование полученных данных проводили с помощью программы Dorado v0.8.3 (Oxford Nanopore, Англия), с использованием модели sup@v5.0.0 на базе ПО Linux и графической видеокарты NVIDIA GeForce RTX 3060.

Биоинформатическая обработка полученных данных секвенирования

При анализе 16S ампликонов полученные риды в виде fastq файлов фильтровали по длине (от 1200 до 1800 пн) и качеству ($Q > 15$) с помощью программы NanoFilt (<https://github.com/wdecoster/nanofilt>). Аналогично по качеству фильтровали риды метагеномного секвенирования. После фильтрации ридов 16S секвенирования проводили таксономический анализ с помощью программы – пайплайна 16s workflow (<https://github.com/epi2me-labs/wf-16s>) приложения Epi2me с использованием классификатора minimap2 (Oxford Nanopore Technologies, Англия). Таксономический анализ ридов метагеномного секвенирования осуществляли с помощью программы – пайплайна wf-metagenomics (<https://github.com/epi2me-labs/wf-metagenomics>) приложения Epi2me с использованием классификатора Kraken2 (Oxford Nanopore Technologies, Англия).

Результаты и обсуждение

Всего было проанализировано пять образцов коммерчески доступных пробиотиков с известным из инструкции производителя составом. Как при секвенировании 16S рРНК, так и при метагеномном секвенировании качество прочтений было достаточно высоким, составив в медианном значении 16 для 16S рРНК (Рис. 1А) и 15 для метагенома (рис. 1Б).

Образец 1

В образец 1, согласно инструкции производителя, входили следующие микроорганизмы: *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactocaseibacillus casei*, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*. Процентное соотношение вышеупомянутых культур, указанное производителем, представлено на рис. 2А. Методом секвенирования 16S рРНК в образце 1 были обнаружены все заявленные производителем виды микроорганизмов, кроме бифидобактерий, а *Lactobacillus helveticus* представлен лишь в следовых количествах (рис. 2Б). Методом секвенирования метагенома удалось обнаружить все заявленные производителем виды,

включая бифидобактерии (рис. 2B), однако *Lactobacillus helveticus* и *Bifidobacterium breve* выявлены лишь в следовых количествах. Зато обильно представлены близкородственные им виды *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium animalis*, соответственно, что может говорить об артефакте работы программы при идентификации близкородственных видов микроорганизмов (рис. 2Б, В).

Образец 2

В образец 2, согласно инструкции производителя, входили следующие микроорганизмы: *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Ligilactobacillus salivarius*. Методом секвенирования 16S рРНК в образце 1 были обнаружены все заявленные производителем виды микроорганизмов, кроме бифидобактерий, а *Limosilactobacillus fermentum* и *Lactobacillus acidophilus* обнаружены лишь в следовых количествах (рис. 3А). Методом секвенирования метагенома удалось обнаружить все заявленные производителем виды, включая бифидобактерии (рис. 3Б).

Образец 3

В образец 3, согласно инструкции производителя, входили следующие микроорганизмы: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*. Методом секвенирования 16S рРНК в образце 1 были обнаружены все заявленные

производителем виды микроорганизмов, кроме бифидобактерий, а *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* найдены лишь в следовых количествах (рис. 4А). Методом секвенирования метагенома удалось установить все заявленные производителем виды, включая бифидобактерии (рис. 4Б), при этом больше всего представлена была *Bifidobacterium bifidum*.

Образец 4

В образец 4, согласно инструкции производителя, входили следующие микроорганизмы: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*. Процентное соотношение вышеупомянутых культур, указанное производителем, представлено на рисунке 5А. Методом секвенирования 16S рРНК в образце 1 были выявлены все заявленные производителем виды микроорганизмов, кроме бифидобактерий (рис. 5Б), а методом секвенирования метагенома удалось обнаружить все заявленные производителем виды, включая бифидобактерии (рис. 5В).

Образец 5

В образец 5, согласно инструкции производителя, входили следующие микроорганизмы: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*. Методом секвенирования 16S рРНК в образце 5 были обнаружены все заявленные производителем виды микроорганизмов, кроме бифидобактерий (рис. 6А), а методом секвенирования метагенома удалось подтвердить все заявленные производителем виды, включая бифидобактерии, кроме *Bifidobacterium lactis*, вместо которого присутствует *Bifidobacterium animalis* (рис. 6Б).

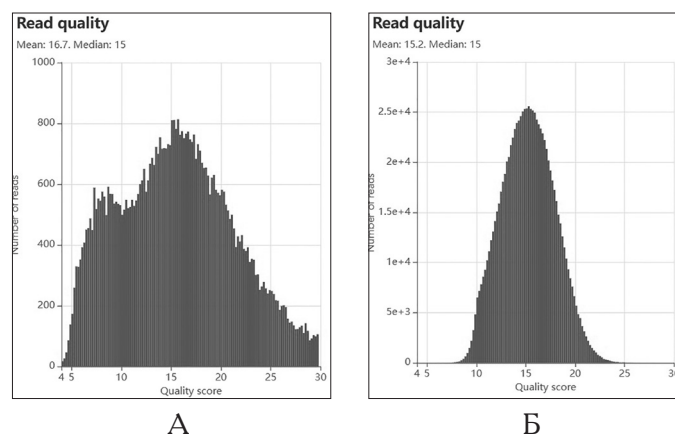
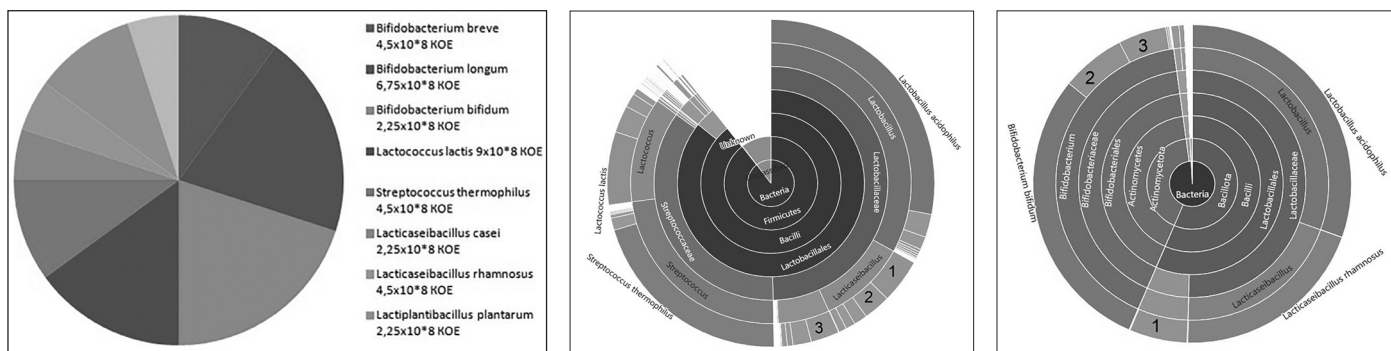


Рис. 1. Примеры диаграмм качества прочтения для 16S рРНК (А) и метагеномного секвенирования (Б)

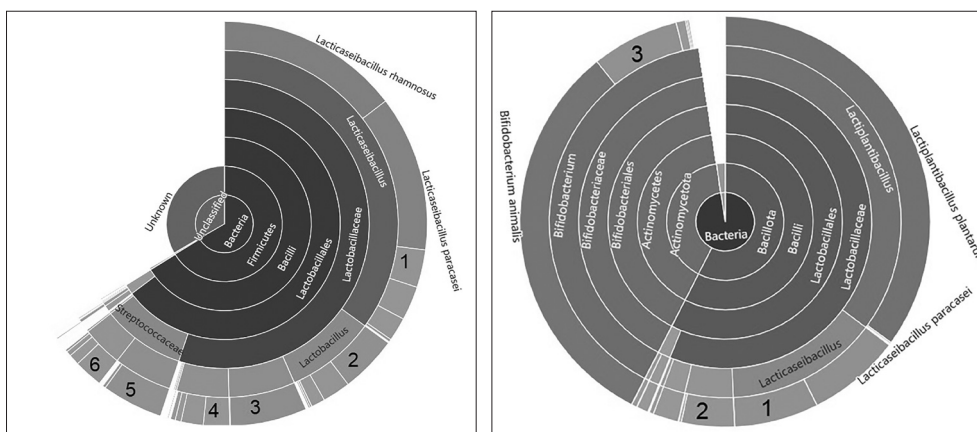


А

Б

В

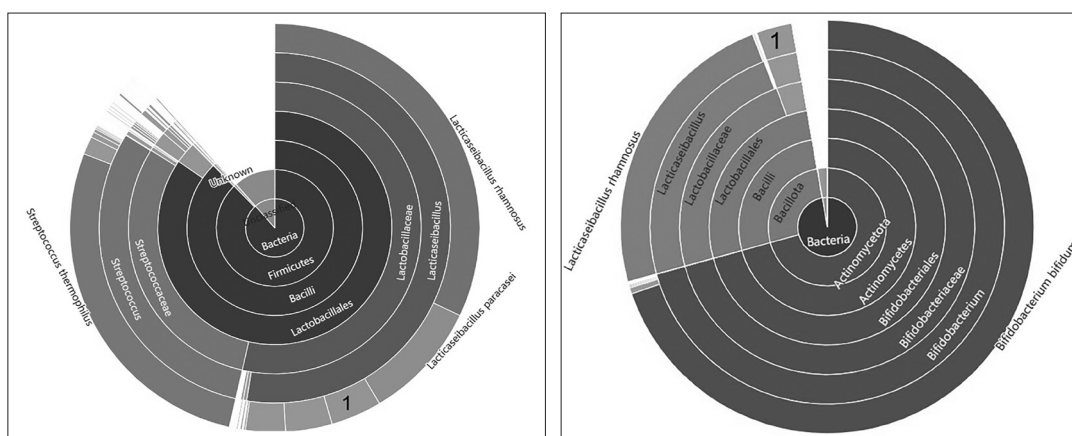
Рис. 2. А – круговая диаграмма, представляющая процентный состав видов, заявленный производителем пробиотика. Б – круговая диаграмма видового состава образца 1, полученная при помощи секвенирования 16S рРНК. 1 – *Lactiseibacillus casei*, 2 – *Lactiseibacillus rhamnosus*, 3 – *Lactiplantibacillus plantarum*. В – круговая диаграмма видового состава образца 1, полученная при помощи секвенирования метагенома. 1 – *Streptococcus thermophilus*, 2 – *Bifidobacterium animalis*, 3 – *Bifidobacterium longum*



А

Б

Рис. 3. А – круговая диаграмма видового состава образца 2, полученная при помощи секвенирования 16S рРНК. 1 – *Lactiseibacillus casei*, 2 – *Lactobacillus delbrueckii*, 3 – *Ligilactobacillus salivarius*, 4 – *Lactiplantibacillus plantarum*, 5 – *Streptococcus thermophilus*, 6 – *Lactococcus lactis*. Б – круговая диаграмма видового состава образца 1, полученная при помощи секвенирования метагенома. 1 – *Lactiseibacillus rhamnosus*, 2 – *Lactobacillus acidophilus*, 3 – *Bifidobacterium longum*



А

Б

Рис. 4. А – круговая диаграмма видового состава образца 2, полученная при помощи секвенирования 16S рРНК. 1 – *Lactiseibacillus casei*. Б – круговая диаграмма видового состава образца 1, полученная при помощи секвенирования метагенома. 1 – *Streptococcus thermophilus*

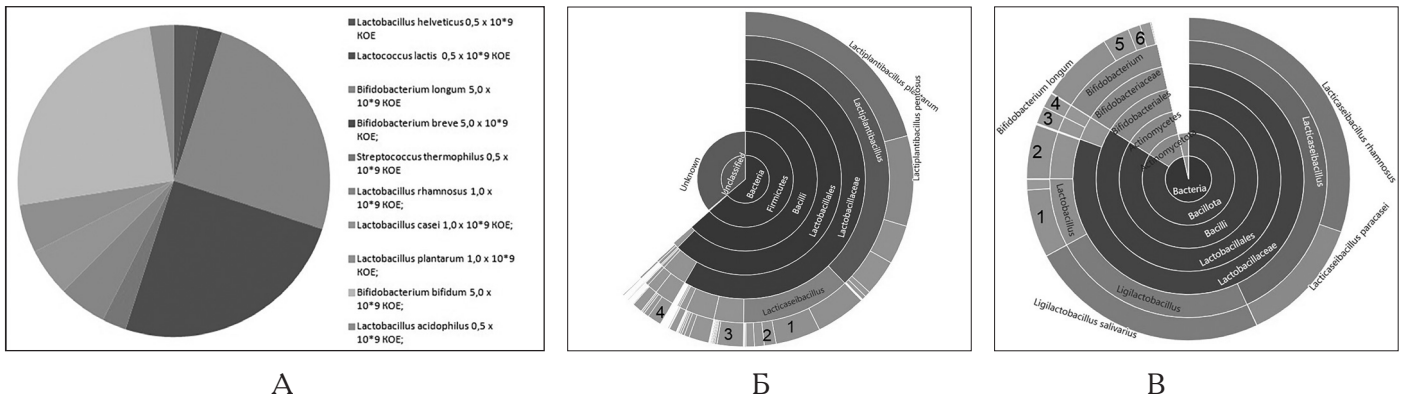


Рис. 5. А – круговая диаграмма, представляющая процентный состав видов, заявленный производителем пробиотика. Б – круговая диаграмма видового состава образца 4, полученная при помощи секвенирования 16S рРНК. 1 – *Lactococcus lactis*, 2 – *Lactobacillus acidophilus*, 3 – *Lactobacillus casei*, 4 – *Lactococcus lactis*. В – круговая диаграмма видового состава образца 4, полученная при помощи секвенирования метагенома. 1 – *Lactobacillus helveticus*, 2 – *Lactiplantibacillus plantarum*, 3 – *Streptococcus thermophilus*, 4 – *Lactococcus lactis*, 5 – *Bifidobacterium breve*, 6 – *Bifidobacterium bifidum*

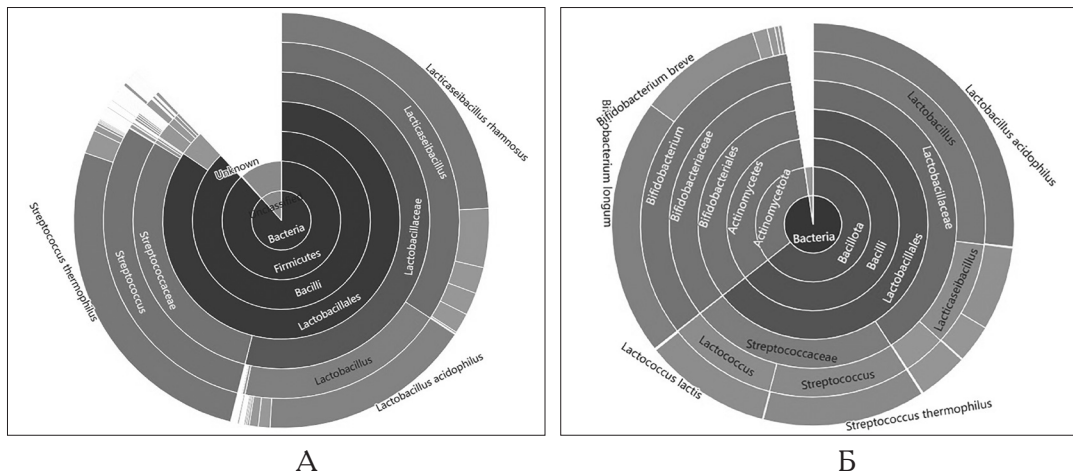


Рис. 6. А – круговая диаграмма видового состава образца 5, полученная при помощи секвенирования 16S рРНК. Б – круговая диаграмма видового состава образца 4, полученная при помощи секвенирования метагенома

Заключение

Можно отметить хорошую применимость обоих методов для быстрой идентификации видового состава коммерческих пробиотиков. Однако следует заметить, что при использовании метода секвенирования 16S рРНК не удалось выявить широко представленные в составе исследованных образцов бифидобактерии, что, скорее всего, объясняется артефактом метода, полученным при амплификации участка 16S рРНК при помощи стандартных вырожденных праймеров. Метагеномное секвенирование, идентифицирующее все присутствующие в смеси виды напрямую, напротив, дало возможность определить практически все заявленные производителями микроорганизмы в соответствующих образцах, с немногими артефактами, связанными с определением

близкородственных видов. В целом, можно рекомендовать нанопоровое секвенирование в качестве экспресс-метода анализа состава пробиотиков и других сходных препаратов, содержащих живые или лиофилизованные культуры микроорганизмов. Более того, подход 16S имеет потенциал для обеспечения разрешения на уровне видов для прокариот, в то время как метагеномные данные открывают перспективу детального исследования популяции бактерий, а также генов устойчивости к противомикробным препаратам и функциональных генов в популяции. Наши результаты показывают, что внедрение технологии нанопорового секвенирования для быстрой оценки таксономического состава может быть применено для оценки качества и безопасности пробиотических продуктов, доступных на рынке. Это принесет пользу устойчивому росту индустрии пробиотиков.

Литература

1. Arsène M.M.J., Davares A.K.L., Andreevna S.L., Vladimirovich E.A., Carime B.Z., Marouf R., Khelifi I. The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics // *Veterinary world*. – 2021. – Vol. 14. – P. 319–328.
2. Berbers B., Saltykova A., Garcia-Graells C., Philipp P., Arella F., Marchal K. Combining short and long read sequencing to characterize antimicrobial resistance genes on plasmids applied to an unauthorized genetically modified *Bacillus* // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – Art. 4310. doi: 10.1038/s41598-020-61158-0.
3. Bhogoju S., Nahashon S. Recent advances in probiotic application in animal health and nutrition: A review // *Agriculture*. – 2022. – Vol. 12. – No. 2. – Art. 304. doi: 10.3390/agriculture12020304.
4. Chen T., Wu Q., Li S., Xiong S., Jiang S., Tan Q., Zhang Z., Zhu D., Wei H. Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China // *Journal of the science of food and agriculture*. – 2014. – Vol. 94. – P. 131–138.
5. Collins J.H., Kunyeit L., Weintraub S., Sharma N., White C., Haq N., Anu-Appaiah K.A., Rao R.P., Young E.M. Genetic basis for probiotic yeast phenotypes revealed by nanopore sequencing // *G3 (Bethesda, Md.)*. – 2023. – Vol. 13. – No. 8. – jkad093. doi: 10.1093/g3journal/jkad093.
6. Dos Santos H.R.M., Argolo C.S., Argôlo-Filho R.C. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information // *BMC microbiology*. – 2019. – Vol. 19. – Art. 74. doi: 10.1186/s12866-019-1446-2.
7. Hamilton-Miller J.M., Shah S. Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements // *International journal of food microbiology*. – 2002. – Vol. 72. – P. 175–176.
8. Jackson S.A., Schoeni J.L., Vegge C., Pane M., Stahl B., Bradley M., Goldman V.S., Burguière P., Atwater J.B., Sanders M.E. Improving end-user trust in the quality of commercial probiotic products // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – Art. 739. doi: 10.3389/fmicb.2019.00739.
9. Jeong J., Yun K., Mun S., Chung W.H., Choi S.Y., Nam Y.D., Lim M.Y., Hong C.P., Park C., Ahn Y.J., et al. The effect of taxonomic classification by full-length 16S rRNA sequencing with a synthetic long-read technology // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – Art. 1727. doi: 10.1038/s41598-020-80826-9.
10. Leggett R.M., Alcon-Giner C., Heavens D. Rapid MinION profiling of preterm microbiota and antimicrobial-resistant pathogens // *Nature Microbiology*. – 2020. – Vol. 5. – P. 430–442.
11. Leggett R.M., Clark M.D. A world of opportunities with nanopore sequencing // *Journal of experimental botany*. – 2017. – Vol. 68. – P. 5419–5429.
12. Lugli G.A., Longhi G., Alessandri G., Mancabelli L., Taracchini C., Fontana F., Turrone F., Milani C., Di Piero F., van Sinderen D. The probiotic identity card: a novel «Probiogenomics» approach to investigate probiotic supplements // *Frontiers in microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – Art. 790881. doi: 10.3389/fmicb.2021.790881.
13. Lugli G.A., Mangifesta M., Mancabelli L., Milani C., Turrone F., Viappiani A., van Sinderen D., Ventura M. Compositional assessment of bacterial communities in probiotic supplements by means of metagenomic techniques // *International journal of food microbiology*. – 2019. – Vol. 294. – P. 1–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.011.
14. Matsuo Y., Komiya S., Yasumizu Y., Yasuoka Y., Mizushima K., Takagi T., Kryukov K., Fukuda A., Morimoto Y., Naito Y., et al. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution // *BMC microbiology*. – 2021. – Vol. 21. – Art. 35. doi: 10.1186/s12866-021-02094-5.
15. Morelli L., Capurso L. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later // *Journal of clinical gastroenterology*. – 2012. – 46 Suppl. – S1–S2. doi: 10.1097/MCG.0b013e318269fdd5.
16. Shehata H.R., Newmaster S.G. Combined targeted and non-targeted PCR based methods reveal high levels of compliance in probiotic products sold as dietary supplements in United States and Canada // *Frontiers in microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – Art. 1095. doi: 10.3389/fmicb.2020.01095.
17. Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products // *International journal of food microbiology*. – 2003. – Vol. 81. – P. 1–10. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00162-9.
18. Ullah M., Raza A., Ye L., Yu Z. Viability and composition validation of commercial probiotic products by selective culturing combined with next-generation sequencing // *Microorganisms*. – 2019. – Vol. 7. – No. 7. – Art. 188. doi: 10.3390/microorganisms7070188.
19. Weese J.S., Martin H. Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy // *Can. Vet. J.* – 2011. – Vol. 52. – No. 1. – P. 43–46.
20. Weese J.S. Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics // *Can. Vet. J.* – 2003. – Vol. 44. – No. 12. – P. 982–983.

References

1. Arsène MMJ, Davares AKL, Andreevna SL, Vladimirovich EA, Carime BZ, Marouf R, Khelifi I. The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary world* 2021; 14:319–328.
2. Berbers B, Saltykova A, Garcia-Graells C, Philipp P, Arella F, Marchal K. Combining short and long read sequencing to characterize antimicrobial resistance genes on plasmids applied to an unauthorized genetically modified *Bacillus*.

- Scientific Reports 2020; 10:4310. doi: 10.1038/s41598-020-61158-0.
3. Bhogaju S, Nahashon S. Recent advances in probiotic application in animal health and nutrition: A review. *Agriculture* 2022; 12(2):304. doi: 10.3390/agriculture12020304.
 4. Chen T, Wu Q, Li S, Xiong S, Jiang S, Tan Q, Zhang Z, Zhu D, Wei H. Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China. *Journal of the science of food and agriculture* 2014; 94:131–138.
 5. Collins JH, Kunyeyit L, Weintraub S, Sharma N, White C, Haq N, Anu-Appaiah KA, Rao RP, Young EM. Genetic basis for probiotic yeast phenotypes revealed by nanopore sequencing. *G3 (Bethesda, Md)* 2023; 13(8):jkad093. doi: 10.1093/g3journal/jkad093.
 6. Dos Santos HRM, Argolo CS, Argôlo-Filho RC. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. *BMC microbiology* 2019; 19:74. doi:10.1186/s12866-019-1446-2.
 7. Hamilton-Miller JM, Shah S. Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements. *International journal of food microbiology* 2002; 72:175–176.
 8. Jackson SA, Schoeni JL, Vegge C, Pane M, Stahl B, Bradley M, Goldman VS, Burguière P, Atwater JB, Sanders ME. Improving end-user trust in the quality of commercial probiotic products. *Frontiers in microbiology* 2019; 10:739. doi:10.3389/fmicb.2019.00739.
 9. Jeong J, Yun K, Mun S, Chung WH, Choi SY, Nam YD, Lim MY, Hong CP, Park C, Ahn YJ, et al. The effect of taxonomic classification by full-length 16S rRNA sequencing with a synthetic long-read technology. *Scientific Reports* 2021; 11:1727. doi:10.1038/s41598-020-80826-9.
 10. Leggett RM, Alcon-Giner C, Heavens D. Rapid MinION profiling of preterm microbiota and antimicrobial-resistant pathogens. *Nature Microbiology* 2020; 5:430–442.
 11. Leggett RM, Clark MD. A world of opportunities with nanopore sequencing. *Journal of experimental botany* 2017; 68:5419–5429.
 12. Lugli GA, Longhi G, Alessandri G, Mancabelli L, Tarracchini C, Fontana F, Turroni, F, Milani C, Di Pierro F, van Sinderen D. The probiotic identity card: a novel «Probiogenomics» approach to investigate probiotic supplements. *Frontiers in microbiology* 2022; 12:790881. doi: 10.3389/fmicb.2021.790881.
 13. Lugli GA, Mangifesta M, Mancabelli L, Milani C, Turroni F, Viappiani A, van Sinderen D, Ventura M. Compositional assessment of bacterial communities in probiotic supplements by means of metagenomic techniques. *International journal of food microbiology* 2019; 294:1–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.011.
 14. Matsuo Y, Komiya S, Yasumizu Y, Yasuoka Y, Mizushima K, Takagi T, Kryukov K, Fukuda A, Morimoto Y, Naito Y, et al. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC microbiology* 2021; 21:35. doi:10.1186/s12866-021-02094-5.
 15. Morelli L, Capurso L. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology* 2012; 46 Suppl:S1–S2. doi:10.1097/MCG.0b013e318269fdd5.
 16. Shehata HR, Newmaster SG. Combined targeted and non-targeted PCR based methods reveal high levels of compliance in probiotic products sold as dietary supplements in United States and Canada. *Frontiers in microbiology* 2020; 11:1095. doi: 10.3389/fmicb.2020.01095.
 17. Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International journal of food microbiology* 2003; 81:1–10. doi:10.1016/s0168-1605(02)00162-9.
 18. Ullah M, Raza A, Ye L, Yu Z. Viability and composition validation of commercial probiotic products by selective culturing combined with next-generation sequencing. *Microorganisms* 2019; 7(7):188. doi:10.3390/microorganisms7070188.
 19. Weese JS, Martin H. Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy. *Can Vet J* 2011; 52(1):43–46.
 20. Weese JS. Evaluation of deficiencies in labeling of commercial probiotics. *Can Vet J* 2003; 44(12):982–983.

RAPID DETERMINATION OF THE TAXONOMIC COMPOSITION OF PROBIOTICS BY NANOPORE SEQUENCING

E.A. ERMAKOVA¹, A.S. BLAGODATSKY¹, D.D. KOZINA^{1,2},
E.S. ZHDANOVA¹, A.M. ERMAKOV^{1,2}

¹ *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Pushchino;*

² *Nanoporus LLC, Moscow Region, Serpukhov*

The market for probiotics as health-supporting biological agents is growing and continues to expand. However, most of the available products in this field are quality controlled using low-resolution methods, which may lead to misidentification and incorrect composition. In this work, we analyzed the composition of a range of commercially available probiotics and compared the results obtained

using 16S rRNA (16S) sequencing and metagenomic data using nanopore sequencing for both approaches. Our results suggest that nanopore sequencing data from 16S amplicons and metagenomic analysis have great potential to provide species-level resolution for prokaryotes when analyzing commercially available probiotics.

Keywords: probiotics, taxonomic composition, nanopore sequencing.

Address:

Ermakov A.M., Ph.D. in biology
leading researcher, head of the genome research laboratory,
ИГЕВ RAS, chief specialist of Nanoporus LLC
E-mail: ao_ermakovy@rambler.ru

Для цитирования:

Ермакова Е.А., Благодатский А.С., Козина Д.Д., Жданова Е.С., Ермаков А.М. Быстрое определение таксономического состава пробиотиков методом нанопорового секвенирования. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):15–23.

For citation:

Ermakova E.A., Blagodatsky A.S., Kozina D.D., Zhdanova E.S., Ermakov A.M. Rapid determination of the taxonomic composition of probiotics by nanopore sequencing. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4):15–23 (in Russian).

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН НА ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ СВОЙСТВА КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА НА КОЗЬЕМ МОЛОКЕ

Г.Е. РЫСМУХАМБЕТОВА, К.Е. БЕЛОГЛАЗОВА*, Л.В. КАРПУНИНА,
М.В. ЗАБЕЛИНА, Т.Б. ЛЕДЯЕВ

*Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова,
Саратов*

В процессе экспериментов исследовано применение порошка плодов рожкового дерева (кэроба) в количестве 0,2–1,2% в рецептуре кисломолочных продуктов (йогурт), изготовленных термостатным способом на основе козьего молока зааненской породы. В ходе оценки органолептических показателей дегустаторами был выбран образец № 3 с концентрацией кэроба 0,6%, который отличался однородной консистенцией, приятным кисломолочным запахом и сладковатым привкусом кэроба. В ходе дальнейшего исследования для улучшения органолептических показателей данного образца было приготовлено 7 образцов кисломолочного продукта с известными наполнителями: хлопья злаковые, сахар, малиновое варенье и джем из черной смородины. В результате проведенных органолептических показателей питьевых кисломолочных продуктов с кэробом были отобраны 3 наилучших образца с разными вкусовыми наполнителями: № 3.1 — малиновым вареньем; № 3.6 — хлопьями злаковыми с сахаром; № 3.7 — сахаром. Физико-химические, микробиологические показатели, а также содержание токсичных элементов и пестицидов в разработанных кисломолочных продуктах на козьем молоке с пищевыми волокнами соответствовали нормативным значениям. Выявлено, что содержание белков и углеводов в разработанной продукции больше на 17%, а содержание жиров увеличилось в 2 раза в сравнении с контролем. Кроме того, новые кисломолочные продукты были богаты витаминно-минеральным комплексом. Таким образом, показана перспективность применения пищевых волокон в кисломолочных продуктах, приготовленных на козьем молоке.

Ключевые слова: козье молоко, кисломолочный продукт, пищевые волокна, непереносимость коровьего молока, показатели качества, молоко коз зааненской породы, пищевая непереносимость, аллергия.

Введение

В соответствии с планами реализации Стратегии повышения качества пищевой продукции до 2030 года (утверждена распоряжением Правительства РФ от 29 июня 2016 г. № 1364-р) одной из важнейших задач является выполнение фундаментальных и поисковых научных исследований в области приоритетных направлений медицины, нутрициологии и диетологии. В свою очередь, данные мероприятия направлены на обоснование принципов оптимального питания человека и совершенствование мер профилактики инфекционных заболеваний.

Козье молоко, а также произведенные из него продукты становятся незаменимыми составляющими

рационов и максимально приближены к составу женского молока по белковой и жировой фракциям. В связи с этим оно является основой здорового питания как для детей грудного возраста, так больных и пожилых людей. Состав козьего молока обладает большим количеством макро- и микроэлементов. В нём содержатся незаменимые аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, минеральные вещества, витамины [1, 2, 7, 9].

Во всем мире существуют разные формы и виды пищевой непереносимости и/или аллергий. К часто встречающимся относится непереносимость (аллергия) цитрусовых, меда, бобовых, сухофруктов, глютена, молока и молочных продуктов. Пищевая непереносимость (аллергия) может развиваться при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, желчевыводящей системы, эндокринной патологии, врожденных и приобретенных ферментопатиях и других заболеваниях, не связанных с нарушениями в системе иммунитета [4].

В случаях выявления пищевой непереносимости или аллергии становится жизненно важным соблюдение диеты и полное исключение продуктов-аллергенов.

© 2024 г. Рысмухамбетова Г.Е., Белоглазова К.Е., Карпунина Л.В., Забелина М.В., Ледаев Т.Б.

* Автор для переписки:

Белоглазова Кристина Евгеньевна

канд. сельскохозяйственных наук, ассистент кафедры «Технологии продуктов питания» ФГБОУ ВО Вавиловский университет

E-mail: k.beloglazova@yandex.ru

В нашей стране индустрия питания и пищевая промышленность в основном ориентированы на массовое потребление и в большинстве случаев не учитывается пищевая непереносимость или сопутствующие заболевания. В то же время наблюдается постоянный рост числа людей, страдающих теми или иными формами пищевой непереносимости, поэтому разработка рецептур и технологий кисломолочной продукции лечебно-профилактического и диетического питания является актуальной задачей [10].

В целом проблема качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов в современном мире является одной из самых актуальных, поскольку, в первую очередь, оказывает влияние на здоровье населения и сохранение генофонда. Эта проблема сегодня остро стоит во всех отраслях пищевой промышленности, в том числе и молочной. Молочные продукты являются наиболее потребляемым продуктом питания во всем мире. Установлено, что молоко коз зааненской породы третьей лактации по содержанию массовой доли жира, белка, казеина, сухого вещества, молочного сахара, минеральных веществ и СОМО имеет достаточно высокие показатели и обладает хорошими качественными характеристиками. Содержание соматических клеток в молоке возрастает с увеличением жирности молока и не зависит от сезонов года.

В свете вышесказанного целью работы являлось изучение молочной продуктивности коз зааненской породы третьей лактации и оценка качественного состава молока, а также влияние пищевых волокон на потребительские свойства кисломолочного продукта — йогурта, выработанного из козьего молока.

Для достижения обозначенной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать количественные и качественные показатели молочной продуктивности коз зааненской породы.

2. Научно обосновать необходимость разработки кисломолочного продукта на козьем молоке с добавлением пищевых волокон (кэроба) для людей с непереносимостью коровьего молока.

3. Определить концентрацию кэроба для кисломолочного продукта на козьем молоке.

4. Подобрать технологические параметры для производства линейки кисломолочных продуктов на козьем молоке с кэробом.

5. Исследовать органолептические, физико-химические и микробиологические показатели разработанных кисломолочных продуктов на козьем молоке с пищевыми волокнами.

6. Рассчитать пищевую и энергетическую ценность разработанных кисломолочных продуктов на козьем молоке с пищевыми волокнами.

Материалы и методы

Работа выполнена на кафедрах «Технологии продуктов питания», «Технология производства и переработки продукции животноводства», «Микробиология и биотехнология», а также в учебно-научно-испытательной лаборатории институтов ветеринарной медицины и фармации и биотехнологии по определению качества пищевой и сельскохозяйственной продукции ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Объектами исследований являлись молоко коз зааненской породы и кисломолочные продукты на козьем молоке с добавлением кэроба (обжаренного порошка плодов рожкового дерева или цератонии стручковой (*Ceratonia siliqua*)).

В качестве сырья для исследования были использованы:

- молоко козье зааненской породы 3 лактации;
- кэроб обжаренный (порошок плодов рожкового дерева) по ТУ 01.13.23-004-29903295-2017, изготовитель ООО «ТрансКэроб-Рус», 105120, Россия, г. Москва;
- варенье малиновое, изготовитель ООО «Вологодский комбинат пищевых продуктов леса», Россия, 160026, Вологодская область, г. Вологда;
- варенье из черной смородины по ТУ 9163-010-51939411-04, изготовитель ООО «ПК» «РАТИБОР». Россия 172200, Тверская область;
- хлопья из смеси 5 злаков (ржаные, овсяные, ячменные, пшеничные, гречневые), не требующие варки, изготовитель ООО «Центральная крупяная компания», 303026, Россия, Орловская область;
- сахар белый «Русский сахар», изготовитель ОАО «Валуйки сахар» по ГОСТ 33222 – 2015;
- культура заквасочная «Йогурт» (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*) по ТУ 10.89.19-026-51070597-2018, изготовитель ООО «Зеленые линии» 143405, РФ, МО, г. Красногорск.

При выполнении научных исследований были использованы общепринятые методы:

- Отбор проб для органолептического анализа проводился по ГОСТ 31981-2013 «Йогурты. Общие технические условия».

- Определение массовой доли жира в опытных образцах проводили кислотным методом согласно ГОСТ

5867-90 п.2 «Молоко и молочные продукты. Методы определения жира».

- *Определение массовой доли белка* проводили по ГОСТ 23327–98 «Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка».

- *Определение массовой доли сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО)* проводили по ГОСТ 31981–2013 п.7.9 «Йогурты. Общие технические условия».

- *Определение титруемой кислотности* проводили по ГОСТ 31976–2012 «Йогурты и продукты йогуртные. Потенциометрический метод определения титруемой кислотности».

- *Определение фосфатазы* проводили по ГОСТ 3623–2015 п.7 «Молоко и молочные продукты. Методы определения пастеризации».

- *Определение массовой доли сахарозы* определяли по ГОСТ Р 54667–2011 п.6 «Молоко и продукты переработки молока. Методы определения массовой доли сахаров».

- *Вязкость (динамическая)* изучалась с использованием ротационного вискозиметра BROOKfield DV2T.

- *Массовую долю свинца и кадмия* определяли согласно ГОСТ 30178–96 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов».

- *Массовую долю мышьяка* определяли по ГОСТ Р 51766–2001 «Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка».

- *Массовую долю ртути* определяли согласно ГОСТ Р 53183-2008 (ЕН 13806:2002) «Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение ртути методом атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара с предварительной минерализацией пробы под давлением».

- *Гексахлорциклопексан (ГХЦГ α , β , γ изомеры), дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) и его метаболиты* в опытных образцах определяли согласно ГОСТ 23452-2015 п.8 (метод хроматографии в тонком слое) «Молоко и молочные продукты. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов».

- *Количество молочнокислых микроорганизмов* определяли в соответствии с ГОСТ 33951–2016 п.8.2 «Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов».

- *Наличие бактерий группы кишечных палочек (БГКП, колиформы)* определяли в соответствии с

ГОСТ 32901–2014 п.8.5 «Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа».

- *Наличие золотистого стафилококка (Staphylococcus aureus)* определяли по ГОСТ 30347-2016 п.8.1 «Молоко и молочная продукция. Методы определения Staphylococcus aureus».

- *Патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы* определяли по ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella».

- *Исследование химического состава разработанных йогуртов* проводили расчетным методом [11].

Для обработки полученного цифрового материала применяли метод вариационной статистики с определением критерия достоверности разницы по таблице Стьюдента – Фишера [3].

Результаты

Молочная продуктивность и качество козьего молока в довольно значительной степени связаны с местом географического расположения хозяйства, занимающегося молочным козоводством, с его пастбищными возможностями, а также рядом других факторов. Динамика молочной продуктивности коз зааненской породы третьей лактации за 305 дней показала разный уровень среднемесячных удоев (табл. 1).

Анализируя полученные данные, представленные в таблице 1, нужно отметить, что зааненские козочки по количеству надоенного молока за третью лактацию имеют достаточно высокие показатели.

Начиная с первого месяца лактации, удои плавно набирали темп по четвертый месяц лактации, а затем к завершению лактации шел на спад. Максимальный среднемесячный удои приходился на третий месяц лактации. Наибольший показатель по среднемесячным надоям были у коз третьей лактации в четвертом месяце.

Таблица 1

Динамика среднемесячных удоев коз

| Показатель | Зааненская порода |
|----------------|-------------------|
| Месяц лактации | Третья лактация |
| I | 54,51±0,50 |
| II | 67,62±0,62 |
| III | 100,31±0,99 |
| IV | 115,47±0,67 |
| V | 70,23±0,63 |
| VI | 62,17±0,51 |
| VII | 53,67±0,40 |
| VIII | 49,41±0,34 |
| IX | 36,15±0,30 |

| | |
|-------------|-------------|
| Х | 26,57±0,31 |
| За лактацию | 636,11±2,59 |

Значительно низкими и практически одинаковыми были среднемесячные удои в восьмом, девятом и десятом месяцах лактации. Минимальное значение среднемесячных удоев было на десятом месяце лактации у коз, что объясняется сукозностью опытных животных.

Козье молоко за счет своих уникальных физико-химических, биологических и низкоаллергенных свойств является наиболее выгодным и полезным, чем молоко других сельскохозяйственных животных, к примеру, коров, в части использования его в целях производства пищевых продуктов [5].

При определении пищевой ценности и технологических свойств козьего молока было установлено высокое содержание массовой доли жира, белка, казеина, сухих веществ, молочного сахара, минеральных веществ и СОМО (табл. 2).

Таблица 2

Физико-химические и санитарно-гигиенические показатели молока подопытных коз

| Показатель | Зааненская порода |
|--|-------------------|
| | третья лактация |
| Сухое вещество, % | 12,34±0,14 |
| СОМО, % | 8,45±0,09 |
| Массовая доля жира, % | 3,89±0,04 |
| Массовая доля белка, % | 3,21±0,09 |
| Казеин, % | 2,41±0,09 |
| Молочный сахар, % | 4,49±0,15 |
| Минеральные вещества, % | 0,75±0,04 |
| Калорийность, ккал/100 г | 67,75 |
| Плотность молока, кг/м ³ | 1028,3±0,13 |
| Кислотность молока, °Т | 18,34±0,41 |
| Температура замерзания, °С | -0,52 |
| Вязкость, Па/с, ×10 ⁻³ | 1,6 |
| Соматические клетки, тыс./см ³ | 442,6±10,6 |
| Бактериальная обсеменённость, тыс./см ³ | до 300 |

По данным физико-химического анализа молока коз, представленного в таблице 2, видно, что молоко коз зааненской породы содержит большое количество сухого вещества. Соответственно, и содержание основных питательных веществ молока: белка, жира и молочного сахара, минеральных веществ также высоко.

Многие авторы, такие, например, как: А. Оразов, А.В. Ткачев, Н.Г. Чамурлиев, А.С. Шперов, И.С. Шенгелия, А.А. Зыкова, А.Л. Чекунова, А.Б. Оспанов, Б.О. Кулжанова, Е.М. Щетинина, Ш.М. Велямов,

Р.К. Макеева, М.Д. Бектурсунова, считают, что при изучении молочной продуктивности коз крайне важно учитывать показатели физико-химического, микробиологического состава и свойств их молока, так как от них зависит пищевая ценность и качествоготавливаемых из него молочных продуктов [5, 6, 8, 13].

При разработке кисломолочного продукта — йогурта за контрольный образец была взята известная рецептура [12].

Для проведения органолептических исследований и определения оптимальной концентрации компонентов было отобрано 6 образцов с разной концентрацией порошка плодов рожкового дерева (кэроба): образец № 1 — 0,2%, № 2 — 0,4%, № 3 — 0,6%, № 4 — 0,8%, № 5 — 1,0%, № 6 — 1,2%.

Технологический процесс производства кисломолочного продукта проводили термостатным способом: козье молоко подвергали пастеризации при 92±2 °С с выдержкой 2–8 мин и охлаждали до температуры заквашивания 38–42 °С. В подготовленную для заквашивания молочную смесь вводили закваску, содержащую молочнокислые бактерии *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* и порошок плодов рожкового дерева в концентрации от 0,2 до 1,2% с шагом 0,2%, сквашивали от 10 до 12 часов до кислотности 93±2 °Т, после чего осуществляли одновременное перемешивание до однородной консистенции, охлаждали при температуре от 2–6 °С.

В результате эксперимента было установлено, что опытные образцы с концентрацией от 0,2 до 0,4% характеризовались однородной, в меру вязкой консистенцией с приятным незначительным привкусом кэроба. При увеличении дозировки порошка плодов рожкового дерева свыше 0,6% присутствовал привкус горечи и неприятная вязкая консистенция. В результате проведенных исследований было выявлено, что концентрация вносимого полисахарида (кэроба) оказывает существенное влияние на консистенцию готового продукта.

Таким образом, в ходе оценки органолептических показателей был выбран образец № 3 с концентрацией кэроба 0,6%, который отличался однородной консистенцией, приятным кисломолочным запахом и сладковатым привкусом кэроба (рис. 1).

В ходе дальнейшего исследования для улучшения органолептических показателей отобранного образца № 3 с концентрацией порошка плодов рожкового дерева 0,6% было приготовлено 7 образцов кисломолочного продукта с известными наполнителями: хлопья злаковые, сахар, малиновое варенье и джем из черной смородины.

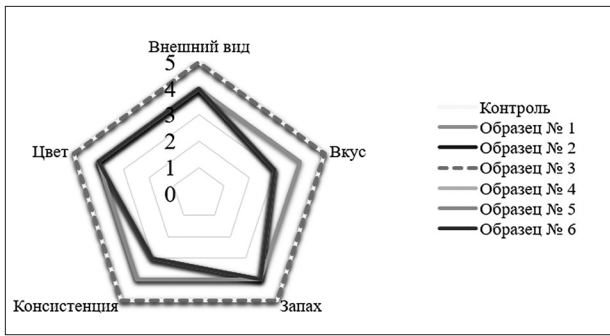


Рис. 1. Органолептические профили опытных образцов кисломолочного продукта с добавлением порошка плодов рожкового дерева

Рецептуры исследуемых образцов представлены в таблице 3.

По результатам органолептической оценки (рис. 2) кисломолочный продукт (йогурт) из козьего молока без наполнителя характеризовался однородной

консистенцией, вкус и запах — кисломолочный, цвет молочно-белый, равномерный по всей массе со средним баллом $5,0 \pm 0,0$.

В ходе органолептических исследований образец № 3.1 ($4,8 \pm 0,2$ балла) отличался в меру вязкой консистенцией с приятным кисло-сладким привкусом малины с кремовым оттенком, а образец № 3.4 ($4,2 \pm 0,2$ балла) имел слабовыраженный вкус малины. В свою очередь, образцы № 3.2 ($4,0 \pm 0,0$ балла) и № 3.5 ($3,8 \pm 0,2$ балла) получили низкие баллы из-за ярко выраженного вкуса и запаха смородины. Образец № 3.3 ($3,8 \pm 0,2$ балла) и № 3.6 ($5,0 \pm 0,0$ баллов) отличались разной концентрацией злаков. Добавление в кисломолочный продукт злаков с концентрацией 6% не оказывало влияние на увеличение вязкости, что доказывается исследованием [14]. Образец № 3.7 при добавлении сахара в отличие от контроля обладал не только чистым кисломолочным привкусом, но и обладал приятной сладостью.

Таблица 3

Матрица эксперимента исследуемых образцов кисломолочных продуктов

| Наименование сырья | Контроль | № 3 | № 3.1 | № 3.2 | № 3.3 | № 3.4 | № 3.5 | № 3.6 | № 3.7 |
|-----------------------------|----------|--------|---------------|--------|--------|--------|--------|---------------|---------------|
| Козье молоко, г | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Закваска, г | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 |
| Кэроб, г | - | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| Хлопья злаковые, г | - | - | - | - | 15 | - | - | 6 | - |
| Сахар, г | - | - | - | - | 10 | - | - | 10 | 10 |
| Малиновое варенье, г | - | - | 15 | - | - | 10 | - | - | - |
| Джем из черной смородины, г | - | - | - | 15 | - | - | 10 | - | - |
| Итого сырья | 100,37 | 100,97 | 115,97 | 115,97 | 125,97 | 110,97 | 110,97 | 116,97 | 110,97 |

В результате оценки органолептических показателей питьевых кисломолочных продуктов с кэробом были отобраны 3 наилучших образца с разными вкусовыми наполнителями: № 3.1 — малиновым вареньем; № 3.6 — хлопьями злаковыми с сахаром; № 3.7 — сахаром.

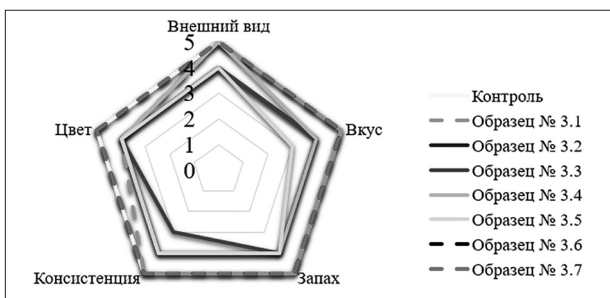


Рис. 2. Органолептические профили опытных образцов кисломолочного продукта с разными наполнителями

Технологический процесс производства кисломолочных продуктов с наполнителями проводили также термостатным способом: козье молоко подвергали пастеризации при температуре 92 ± 2 °C с выдержкой 2–8 мин и охлаждали до температуры заквашивания 38–42 °C. В подготовленную для заквашивания молочную смесь вводили закваску, содержащую молочнокислые бактерии *S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. casei* и наполнители (кэроб с сахаром, злаками с сахаром или малиновым вареньем), и сквашивали от 10 до 12 часов до кислотности 93 ± 2 °T. После этого осуществляли одновременное перемешивание до однородной консистенции, охлаждали при температуре от 2–6 °C.

В таблице 4 представлены результаты физико-химических исследований кисломолочных продуктов на козьем молоке.

Физико-химические показатели качества разработанных кисломолочных продуктов

| Наименование показателя, ед. изм. | Кисломолочные продукты из козьего молока | | | | Нормы по НД |
|--------------------------------------|--|---------------|---------------|---------------|-------------|
| | Контроль | Образец № 3.1 | Образец № 3.6 | Образец № 3.7 | |
| Массовая доля жира, % | 2,70±0,06 | 2,80±0,06 | 2,80±0,06 | 2,80±0,06 | 0,1–10 |
| Массовая доля белка, % | 3,21±0,06 | 3,00±0,06 | 3,00±0,06 | 3,06±0,06 | ≥2,8 |
| Массовая доля СОМО, % | 9,1 | 31,4 | 9,0 | 9,1 | ≥8,5*; 9,5 |
| Титруемая кислотность, °Т | 93,15±1,60 | 93,05±1,60 | 92,40±1,60 | 92,70±1,60 | - |
| Фосфатаза | отсутствует | отсутствует | отсутствует | отсутствует | - |
| Массовая доля сахарозы, % | 13,7±0,5 | 15,9±0,5 | 13,8±0,5 | 15,0±0,8 | - |
| Вязкость (динамическая) Па·с | 2,25 | 1,69 | 2,19 | 1,45 | - |

Примечание: * – массовая доля СОМО в молочной основе для йогуртов с компонентами должна быть не менее 8,5% в соответствии с требованиями

По результатам физико-химических исследований, показатель массовой доли жира во всех опытных образцах составлял 2,8%, что на 0,1% выше контроля, а массовая доля белка не менее 2,8%, что в пределах ГОСТ 31981-2013.

От других кисломолочных продуктов, таких как ряженка, кефир, йогурт отличается повышенным содержанием сухих обезжиренных веществ молока (СОМО). Содержание СОМО в йогурте без добавок должно быть не менее 9,5%, а в йогуртах с наполнителями – не менее 8,5%. Чем больше в йогурте массовая доля молочного белка, сухого молочного остатка, тем консистенция становится плотнее. Все опытные образцы с наполнителями имели массовую долю СОМО в молочной основе для йогуртов не менее 8,5%, что также в пределах ГОСТ 31981-2013.

По показателю кислотности образцы 3.1, 3.6 и 3.7 были приближены к контролю, а также соответствовали нормативному диапазону от 75 до 140 °Т включительно.

Наличие фосфатазы во всех опытных образцах не было выявлено.

Массовая доля сахарозы в образцах № 3.1 и 3.7 была выше контроля на 2,2% и 1,3% соответственно. Образец № 3.6 был больше контроля на 0,1%, при этом сахар в йогурте присутствовал, но предположительно из-за добавления злаков количество сахарозы уменьшилось практически до уровня контрольного образца. Так как известно, что злаки богаты клетчаткой, а она, в свою очередь, задерживает глюкозу.

Вязкость кисломолочных продуктов зависит от массовой доли сухих веществ. Высокое значение вязкости наблюдали и в контроле и образце № 3.6. Добавление злаков в образец № 3.6 способствовало увеличению вязкости сгустков. Вязкость в образце 23.6 была сопоставима с вязкостью контроля.

В таблице 5 представлены результаты исследования по содержанию токсичных элементов и пестицидов в кисломолочных продуктах.

Содержание токсичных элементов и пестицидов в кисломолочных продуктах, мг/кг (л), не более

| Наименование показателя, ед. изм. | Кисломолочные продукты из козьего молока | | | | Нормы по НД |
|--|--|---------------|---------------|---------------|-------------|
| | Контроль | Образец № 3.1 | Образец № 3.6 | Образец № 3.7 | |
| Токсичные элементы: | | | | | |
| Массовая доля свинца, мг/кг | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | ≤0,1 |
| Массовая доля мышьяка, мг/кг | <0,01* | <0,01* | <0,01* | <0,01* | ≤0,05 |
| Массовая доля кадмия, мг/кг | <0,01* | <0,01* | <0,01* | <0,01* | ≤0,03 |
| Массовая доля ртути, мг/кг | <0,002* | <0,002* | <0,002* | <0,002* | ≤0,005 |
| Пестициды: | | | | | |
| ГХЦГ (α , β , γ изомеры), мг/кг | <0,05* | <0,05* | <0,05* | <0,05* | ≤0,05 |
| ДДТ и его метаболиты, мг/кг | <0,05* | <0,05* | <0,05* | <0,05* | ≤0,05 |

Примечание: * – менее нижнего предела обнаружения по методике испытаний

Как видно из данных таблицы 5, остаточное количество пестицидов, токсичных элементов в кисломолочных продуктах не превышало допустимых уровней, установленных в приложениях № 1–4 к техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) и «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033.2013).

Таким образом, массовая доля свинца исследуемых кисломолочных продуктов не была более 0,1, а остальных токсичных элементов и пестицидов было меньше нижнего предела обнаружения по методике испытаний.

Микробиологические показатели опытных образцов представлены в таблице 6.

Таблица 6

Микробиологические показатели разработанных кисломолочных продуктов

| Наименование показателя, ед. изм. | Кисломолочные продукты из козьего молока | | | | Нормы по НД |
|---|--|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| | Контроль | Образец № 3.1 | Образец № 3.6 | Образец № 3.7 | |
| Молочнокислые микроорганизмы (на конец/в течение срока годности), КОЕ/см ³ | 1,0·10 ⁷ | 5·10 ⁷ | 1,5·10 ⁷ | 2,5·10 ⁷ | ≥1·10 ⁷ |
| Бактерии группы кишечных палочек (БГКП, колиформы) | - | - | - | - | Не допускаются в 0,01 г |
| Золотистый стафилококк (<i>Staphylococcus aureus</i>) | - | - | - | - | Не допускаются в 1 г |
| Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы | - | - | - | - | Не допускаются в 25 г |

Примечание: «-» – не обнаружено

Из таблицы 6 видно, что больше всего молочнокислых бактерий отмечено в образце 3.1 и 3.7 по сравнению с контролем. Количество БГКП, золотистого стафилококка (*S. aureus*) и патогенных микроорганизмов в йогуртах не обнаружено, что соответствует нормам ТР/ТС – 021/2011 и подтверждает их безопасность.

В процессе исследования был проведен анализ пищевой и энергетической ценности разработанных образцов кисломолочного продукта по сравнению с контролем, представленный в таблице 7.

Анализируя данные таблицы 7, видно, что происходило увеличение белка во всех разработанных образцах кисломолочных продуктов из козьего молока в среднем на 18% по сравнению с контролем, приготовленным из

коровьего молока, что связано с заменой коровьего молока на козье и введением кэроба в рецептуры образцов. Содержание жиров во всех разработанных образцах кисломолочных продуктов из козьего молока увеличилось в 2 раза в сравнении с контролем, что также связано с заменой коровьего молока на козье. Исходя из данных таблицы 7, видно, что содержание углеводов в разработанных образцах увеличилось в среднем на 17% по сравнению с контролем. В данном случае это связано с введением злаков и малинового варенья в образцы 3.6 и 3.7 соответственно. Содержание энергетической ценности в опытных образцах по сравнению с контролем возросло в среднем на 36%, что связано с их обогащением кэробом, злаками и малиновым вареньем.

Таблица 7

Пищевая и энергетическая ценность разработанных кисломолочных продуктов на 100 г

| Наименование вещества | Ед. изм. | Кисломолочный продукт | | | |
|-------------------------|----------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
| | | контроль | Образец № 3.1 | Образец № 3.6 | Образец № 3.7 |
| Белки | г | 11,20 | 12,4 | 12,70 | 14,60 |
| Жиры | г | 16,20 | 32,2 | 32,40 | 33,50 |
| Углеводы | г | 46,00 | 48,40 | 52,70 | 61,50 |
| Энергетическая ценность | ккал | 73,40 | 92,70 | 97,90 | 109,70 |
| Пищевые волокна | г | - | 39,8 | 41,80 | 45,80 |
| Витамины | | | | | |
| А | мкг | 24,08 | 51,72 | 52,11 | 51,72 |
| РР | мг | 0,09 | 0,80 | 0,93 | 0,80 |

| | | | | | |
|----------------------|-----|--------|--------|--------|--------|
| B1 | мг | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,03 |
| B2 | мг | 0,17 | 0,12 | 0,13 | 0,12 |
| D | мкг | 0,02 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| C | мг | 1,12 | 1,70 | 2,66 | 1,70 |
| E | мг | 0,08 | 0,08 | 0,15 | 0,10 |
| Минеральные вещества | | | | | |
| Na | мг | 40,42 | 40,76 | 42,50 | 40,80 |
| K | мг | 120,40 | 129,30 | 150,90 | 131,50 |
| Ca | мг | 103,20 | 125,24 | 127,40 | 125,60 |
| P | мг | 79,12 | 77,10 | 79,19 | 110,20 |
| Fe | мг | 0,09 | 0,12 | 0,25 | 0,20 |

Так же, как видно из таблицы 7, происходило увеличение витамина А в среднем в 2 раза и витамина РР в 8 раз во всех разработанных образцах по сравнению с контролем. Что касается витамина В1, то его содержание выросло только в образце № 3.7 за счет добавления малинового варенья. В случае с витамином В2 его количество незначительно снизилось по сравнению с контролем. В опытных образцах произошло увеличение витамина D в 1,5 раза, а витамина С — в среднем в 1,2 раза по сравнению с контролем. Что касается витамина Е, то его содержание увеличилось в образце 3.6 на 25%, а в образце 3.7 на 100%, по сравнению с контролем. Содержание К, Fe, Са в среднем увеличилось на 20% относительно контроля, а содержание Na и P изменилось незначительно.

Заключение

На основании проделанной работы сделаны следующие выводы:

1. Молоко коз зааненской породы третьей лактации по содержанию массовой доли жира, белка, казеина, сухого вещества, молочного сахара, минеральных веществ и СОМО имеет достаточно высокие показатели и обладает хорошими качественными характеристиками. Содержание соматических клеток в молоке возрастает с увеличением жирности молока и не зависит от сезона года.

2. Научно обоснована необходимость разработки кисломолочного продукта (йогурта) на козьем молоке с добавлением пищевых волокон для людей с непереносимостью коровьего молока.

3. Определены концентрации кэроба для линейки кисломолочных продуктов на козьем молоке. Так, согласно органолептическим исследованиям, отобран образец № 3 с концентрацией кэроба 0,6%, № 3.6 — с добав-

лением малинового варенья и № 3.7 — с добавлением хлопьев злаковых.

4. Подобраны технологические параметры для производства линейки кисломолочных продуктов (йогурт) на козьем молоке с кэробом.

5. Исследованы органолептические, физико-химические и микробиологические показатели разработанных кисломолочных продуктов (йогурт) на козьем молоке с пищевыми волокнами (кэроб).

6. Рассчитанная пищевая и энергетическая ценность разработанных кисломолочных продуктов — йогуртов на козьем молоке с пищевыми волокнами (кэроб) свидетельствует о том, что по содержанию белка, жиров, углеводов, витаминов и минералов данный продукт превосходит контрольные значения и соответствует потребительским свойствам кисломолочных продуктов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Литература

1. Волкова Л.Ю., Никитина Е.А., Орлова С.В. Изучение целесообразности использования в питании уязвимых групп населения обогащенного продукта на основе козьего молока // Медицинский алфавит. — 2023. — № 8. — С. 14–22.
2. Кудряшова О.В. Перспективы оптимизации состава козьего молока для применения в продуктах детского питания // Вестник АПК Верхневолжья. — 2023. — № 2(62). — С. 106–111.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
4. Лусс Л.В. Пищевая аллергия и пищевая непереносимость, терминология, классификация, проблемы диагностики и терапии // Вестник семейной медицины. — 2016. — № 2. — С. 30–37.

5. Оразов А., Надтозий Л.А., Сафронова А.В. Оценка биологической ценности молока сельскохозяйственных животных // Техника и технология пищевых производств. — 2019. — Т. 49. — № 3. — С. 447–453.
6. Оспанов А.Б., Кулжанова Б.О., Щетинина Е.М., Велямов Ш.М., Макеева Р.К., Бектурсунова М.Д. Исследование физико-химического состава и технологических свойств овечьего и козьего молока в летний период лактации // Хранение и переработка сельхозсырья. — 2021. — № 2. — С. 64–74.
7. Сафина А.К., Гайнуллина М.К. Молочное козоводство: значение, состояние и перспективы развития в России // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. — 2022. — Т. 250. — № 2. — С. 208–213.
8. Ткачев А.В. Зооигиеническая оценка бактериального загрязнения козьего молока Белгородской области // Актуальные вопросы сельскохозяйственной биологии. — 2020. — № 2(16). — С. 120–126.
9. Трухачев В.И., Селионова М.И., Айбазов А.-М.М. и др. Сравнительный анализ компонентного состава молока коз и овец // Зоотехния. — 2023. — № 2. — С. 32–37.
10. Тутельян В.А., Мусина О.Н., Балыхин М.Г. и др. Цифровая нутрициология: применение информационных технологий при разработке и совершенствовании пищевых продуктов. — Москва; Барнаул: Азбука, 2020. — 378 с.
11. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник. Под ред. член-корр. МАИ, проф. И.М. Скурихина и академика РАМН, проф. В.А. Тутельяна. — М.: ДеЛи принт, 2002 — 236 с.
12. Храмов А.Г., Василин С.В. Справочник технолога молочного производства. Технология и рецептуры. Том 1. Цельномолочные продукты. — Санкт-Петербург: Гиорд, 1999. — 384 с.
13. Чамурлиев Н.Г., Шперов А.С., Шенгелия И.С., Зыкова А.А., Чекунова А.Л. Молочная продуктивность и качество молока коз зааненской породы разного типа телосложения // Овцы, козы, шерстяное дело. — 2020. — № 3. — С. 16–18.
14. Шлейкин А.Г., Баракова Н.В., Петрова М.Н. и др. Влияние сахарного сиропа, меда и злаков на реологические свойства йогурта // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». — 2015. — № 2. — С. 24–34.
2. Kudryashova OV. Perspektivy optimizatsii sostava koz'yego moloka dlya primeneniya v produktakh detskogo pitaniya. Vestnik APK Verkhnevolzh'ya 2023; 2(62):106–111 (in Russian).
3. Lakin GF. Biometriya. Moscow: Vysshaya shkola, 1990: 352 (in Russian).
4. Luss LV. Pishchevaya allergiya i pishchevaya neperenosimost', terminologiya, klassifikatsiya, problemy diagnostiki i terapii. Vestnik semeynoy meditsiny 2016; 2:30–37 (in Russian).
5. Orazov A, Nadtoziy LA, Safronova AV. Otsenka biologicheskoy tsennosti moloka sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh. Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv 2019; 49(3):447–453 (in Russian).
6. Ospanov AB, Kulzhanova BO, Shchetinina YeM, Velyamov ShM, Makeyeva RK, Bektursunova MD. Issledovaniye fiziko-khimicheskogo sostava i tekhnologicheskikh svoystv ovech'yego i koz'yego moloka v letniy period laktatsii. Khraneniye i pererabotka sel'khozsyrya 2021; 2:64–74 (in Russian).
7. Safina AK, Gaynullina MK. Molochnoye kozovodstvo: znacheniyе, sostoyaniye i perspektivy razvitiya v Rossii. Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im NE Baumana 2022; 250(2):208–213 (in Russian).
8. Tkachev AV. Zoogigiyenicheskaya otsenka bakterial'nogo zagryazneniya koz'yego moloka Belgorodskoy oblasti. Aktual'nyye voprosy sel'skokhozyaystvennoy biologii 2020; 2(16):120–126 (in Russian).
9. Trukhachev VI, Selionova MI, Aybazov A-MM i dr. Sravnitel'nyy analiz komponentnogo sostava moloka koz i ovets. Zootekhnika 2023; 2:32–37 (in Russian).
10. Tutel'yan VA, Musina ON, Balykhin MG i dr. Tsifrovaya nutritsiologiya: primeneniye informatsionnykh tekhnologiy pri razrabotke i sovershenstvovanii pishchevykh produktov. Moskva; Barnaul: Azbuka, 2020: 378 (in Russian).
11. Khimicheskii sostav rossiyskikh pishchevykh produktov: Spravochnik. Pod red chlen-korr MAI, prof IM Skurikhina i akademika RAMN, prof VA Tutel'yana. Moscow: DeLi print, 2002: 236 (in Russian).
12. Khramtsov AG, Vasilin SV Spravochnik tekhnologa molochnogo proizvodstva. Tekhnologiya i retseptury. Tom 1. Tsel'nomolochnyye produkty. St. Petersburg: Giord, 1999: 384 (in Russian).
13. Chamurliyev NG, Shperov AS, Shengeliya IS, Zykova AA, Chekunova AL. Molochnaya produktivnost' i kachestvo moloka koz zaanenskoy porody raznogo tipa teloslozheniya. Ovtсы, kozy, sherstyanoye delo 2020; 3:16–18 (in Russian).
14. Shleikin AG, Barakova NV, Petrova MN and dr. Vliyaniye sakharnogo siropa, meda i zlakov na reologicheskiye svoystva yogurta. Nauchnyy zhurnal NIU ITMO. Seriya «Protssesy i apparaty pishchevykh proizvodstv» 2015; 2:24–34 (in Russian).

References

1. Volkova LYu, Nikitina YeA, Orlova SV. Izucheniye tselesoobraznosti ispol'zovaniya v pitanii uyazvimykh grupp naseleeniya obogashchennogo produkta na osnove koz'yego moloka. Meditsinskiy alfavit 2023; 8:14–22 (in Russian).

DIETARY FIBER INFLUENCE ON THE CONSUMER PROPERTIES OF A FERMENTED MILK PRODUCT BASED ON GOAT'S MILK

G.E. RYSMUKHAMBETOVA, K.E. BELOGLAZOVA, L.V. KARPUNINA,
M.V. ZABELINA, T.B. LEDYAEV

Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov

During our experiments, the use of carob powder in the amount of 0.2–1.2% in the recipe for fermented milk products (yogurt) made by the thermostatic method on the basis of Saanen goat milk was studied. During the assessment of organoleptic indicators, the tasters selected sample No. 3 with a carob concentration of 0.6%, which was distinguished by a uniform consistency, a pleasant fermented milk smell and a sweetish taste of carob. In the course of our further research, 7 samples of fermented milk product with known fillers (cereal flakes, sugar, raspberry and blackcurrant jam) were prepared to improve the organoleptic properties of this sample. As a result of our study of the organoleptic properties of drinkable fermented milk products with carob, 3 best samples with various flavor fillers were selected, namely: No. 3.1 – raspberry jam; No. 3.6 – cereal flakes with sugar; and No. 3.7 – sugar. Physicochemical, microbiological parameters, as well as the content of toxic elements and pesticides in the developed fermented milk products on goat milk with dietary fiber corresponded to the standard value. It was revealed that the content of proteins and carbohydrates in the developed product was 17% higher, and the fat content increased 2 times compared to the control. In addition, the new fermented milk products were rich in vitamin and mineral complex. Thus, the prospects of using dietary fiber in fermented milk products prepared with goat milk were shown.

Keywords: goat's milk, fermented milk product, dietary fiber, cow's milk intolerance, quality indicators, milk of Saanen goats, food intolerance, allergy.

Address:

Beloglazova K.E., Ph.D. in Agricultural Sciences
Assistant of the Department of Food Technology, Vavilov University
E-mail: k.beloglazova@yandex.ru

Для цитирования:

Рысмухамбетова Г.Е., Белоглазова К.Е., Карпунина Л.В., Забелина М.В., Ледяев Т.Б. Влияние пищевых волокон на потребительские свойства кисломолочного продукта на козьем молоке. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):24–33.

For citation:

Rysmukhambetova G.E., Beloglazova K.E., Karpunina L.V., Zabelina M.V., Ledyayev T.B. Dietary fiber influence on the consumer properties of a fermented milk product based on goat's milk. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4):24–33 (in Russian).

ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЯБЛОЧНЫХ ВЫЖИМОК

Б.М. НУРГАЛИЕВА, К.Е. БЕЛОГЛАЗОВА*, Г.Е. РЫСМУХАМБЕТОВА, Л.Г. ЛОВЦОВА

*Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова,
Саратов*

Из данных литературы известно, что в сухих яблочных выжимках содержится достаточно большое количество безазотистых экстрактивных веществ (44,5%), сахара (6,18%), клетчатки (28,8%) и пектина (до 18%). Содержание протеина относительно небольшое (8,09%), но он отличается высокой полноценностью. Целью работы явилось изучение показателей качества яблочных выжимок, получаемые в СПССК «Хвалынский сад» (Россия) из яблок сорта «Беркутовское». Установлено, что представленные яблочные выжимки являются ценным источником пищевых волокон: так, содержание клетчатки 1,20%, в то время как в мякоти данный показатель варьирует от 0,8 до 1,0%. Благодаря высокому содержанию сырого протеина $1,19 \pm 0,38\%$ в опытных образцах яблочных выжимок обнаружена массовая доля азота 0,19%. Массовая доля сырого протеина в опытных образцах сухих яблочных выжимок составила $3,88 \pm 0,44\%$. В свою очередь, этот показатель, согласно данным литературы, колеблется от 1,2–6,90%. В эксперименте в представленных яблочных выжимках зафиксировано высокое содержание кальция и фосфора – 2,12 и 2,29 мг/100 г соответственно. Таким образом, можно сказать, что благодаря своему составу (высокому содержанию сырой клетчатки и протеина, обладающих антиоксидантными свойствами), представленные яблочные выжимки могут оказывать плейотропное кардио- и васкулопротекторное действие, воздействуя на многочисленные сигнальные пути и факторы риска. В результате проведенных исследований определен богатый нутриентный потенциал яблочных выжимок. Показана возможность использования изученного вторичного плодоовощного сырья не только в качестве кормовой базы, но и для конструирования новых продуктов питания.

Ключевые слова: яблочные выжимки, вторичные сырьевые ресурсы, пищевые отходы, физико-химические показатели, показатели качества, органолептические показатели, дегидратор, витамин С, биокомпоненты.

Введение

На данный момент Россия делает попытки переориентировать экономику своей страны в сторону Азии с целью минимизировать негативное влияние западных санкций. Для Китая нынешняя геополитическая ситуация открывает уникальную возможность нарастить свой доступ к минеральным ресурсам Российской Федерации, в частности, к природному газу, а также представить китайские технологии на российском рынке [2].

Главным поставщиком свежих яблок в Россию до введения ответных санкций выступала Польша: на ее долю приходилось 55% импорта, на втором месте располагалась Молдавия с долей в 14,1%, а замыкал тройку Китай с долей 8,6%. Затем лидерство в импорте свежих

яблок перешло к Сербии, поставки из этой страны выросли за три года в 2,3 раза [12].

Причем, с точки зрения природно-климатических условий Россия обладает значительным потенциалом для увеличения объема производства свежих яблок. В последние годы благодаря политике импортозамещения в отечественном плодоводстве наблюдается существенный прогресс. Тем не менее Россия остается одним из крупнейших импортеров яблок в мире, очевидны и проблемы развития отрасли. Анализ статистических данных и научной информации, а также отраслевых обзоров и материалов экспертов, находящихся в открытом доступе, позволяет выявить как препятствия для наращивания эффективного производства яблок в стране, так и направления их преодоления [10].

Согласно нормам потребления, утвержденным Минздравом России, потребность жителей России в плодах и ягодах составляет 100 кг на человека в год, в том числе 50 кг яблок. По словам первого заместителя председателя комитета Совета Федерации по аграрно-продовольственной политике и природопользованию Сергея Митина, в масштабах страны потребность в яблоках оценивается на уровне 7,3 млн т. Удовлетворение

© 2024 г. Нурғалиева Б.М., Белоглазова К.Е., Рысмухамбетова Г.Е., Ловцова Л.Г.

* Автор для переписки:

Белоглазова Кристина Евгеньевна

канд. сельскохозяйственных наук, ассистент кафедры «Технологии продуктов питания» ФГБОУ ВО Вавиловский университет

E-mail: k.beloglazova@yandex.ru

потребностей в свежих плодах и ягодах составляет около 50%, что значительно меньше показателей развитых стран. Дефицит яблок в соответствии с рациональными нормами потребления составляет около 5,7 млн т, однако фактическое потребление еще ниже. По оценке Минсельхоза России, самообеспеченность плодовой продукцией в среднем составляет около 27% [3].

При производстве яблочного сока образуется большое количество выжимок — отходов сокового производства, недостаточно эффективно используемых во многих странах, в том числе и в России. Между тем яблочные выжимки служат богатым источником биологически активных веществ — витаминов С, Р, Е, β-каротина, тритерпеновых соединений, витаминов группы В, минеральных элементов (после отжатия сока из яблок в выжимках остается почти половина общего количества важнейших минеральных элементов), пищевых волокон, в том числе пектиновых веществ [18, 19].

Поэтому развитие технологий переработки яблочных выжимок является актуальной задачей, решение которой необходимо для улучшения экономических показателей переработки яблочного сырья [1].

Целью работы явилось изучение показателей качества яблочных выжимок, получаемые в СПССК «Хвалынский сад» (Россия) из яблок сорта «Беркутовское».

Задачи исследования:

- определить органолептические показатели яблочных выжимок;
- определить физико-химические показатели яблочных выжимок;
- определить витаминно-минеральный состав яблочных выжимок.

Материалы и методы

Исследование проводилось на кафедрах «Технологии продуктов питания» и «Микробиология и биотехнология», а также на базе испытательной лаборатории по определению качества пищевой и сельскохозяйственной продукции ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

Объектом исследования являлись яблочные выжимки, получаемые в СПССК «Хвалынский сад» (Россия) из яблок сорта «Беркутовское».

В ходе исследования для высушивания яблочных выжимок была использована конвективная сушилка «Ezidri Ultra FD1000 Digital». Данный способ сушки является более экономичным и доступным по сравнению с ИК-нагревом. Для высушивания яблочных

выжимок использовали следующие технологические режимы: температура — 40 ± 1 °С и продолжительность — 23 ± 1 ч [15].

Массовую долю влаги определяли согласно ГОСТ 33977-2016 п.5 м А. Продукты переработки фруктов и овощей. Методы определения общего содержания сухих веществ.

Массовую долю азота и массовую долю сырого протеина определяли согласно ГОСТ 13496.4-2019 п.8 (титриметрический метод). Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина.

Массовую долю сырой клетчатки определяли согласно ГОСТ 31675-2012 Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации.

Массовую долю жира определяли согласно ГОСТ 8756.21-89 п.2. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения жира.

Массовую долю сахара определяли с помощью йодометрического метода титрования [14].

Массовую долю титруемых кислот определяли согласно ГОСТ ISO 750-2013. Продукты переработки фруктов и овощей. Определение титруемой кислотности.

Определение содержания некоторых минеральных веществ осуществляли по методике, описанной [14].

Определение витамина С проводили с помощью метода, основанного на титровании пробы в кислой среде натриевой соли 2,6 дихлорфенолиндофенола без предварительного осаждения белка [11].

Биокомпоненты (титруемые кислоты) определяли методом титрования в присутствии цветного индикатора по методу, описанному [4].

Результаты

Для определения органолептических показателей яблочных выжимок использовали 3 образца: 1 — сырой; 2 — высушенный целиком; 3 — порошок. Органолептические показатели опытных образцов представлены в виде таблицы 1.

Внешний вид опытных образцов яблочных выжимок представлен на рисунке 1.

В таблице 2 представлены физико-химические показатели мякоти яблок и двух образцов сырых яблочных выжимок: один получен в результате переработки яблок от СПССК «Хвалынский сад» и другой — по сведениям О.В. Перфиловой (2017) [9].

Таблица 1

Органолептические показатели опытных образцов яблочных выжимок

| Наименование показателей | Опытные образцы | | |
|--------------------------|--|--|--|
| | Сырой | Высушенный | Порошок |
| Цвет | От светло-бежевого до светло-коричневого | Светло-коричневый | Светло-коричневый |
| Консистенция | Мягкая | Плотная | Однородная масса, с небольшими включениями |
| Запах | Яблочный | Яблочный, характерный данному сырью, без постороннего запаха | Ярко-выраженный, без постороннего запаха |

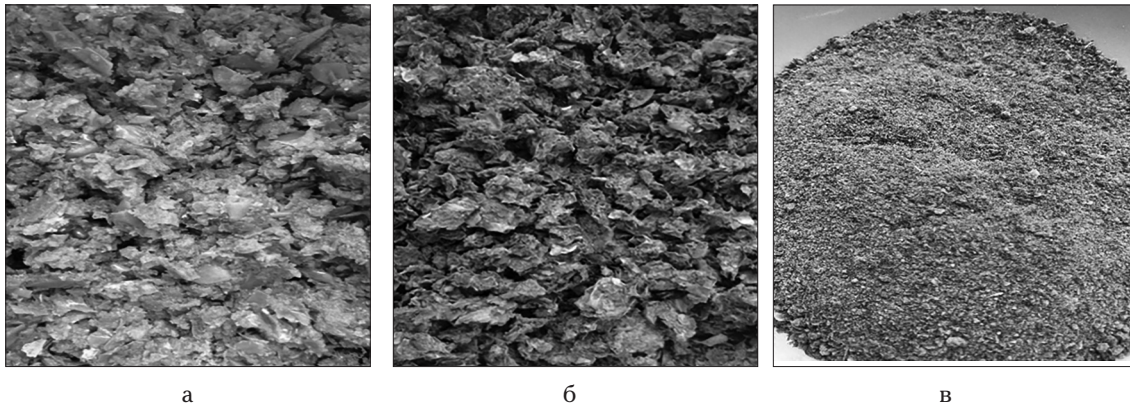


Рис. 1. Внешний вид яблочных выжимок: а – до высушивания (образец 1); б – после конвекционной сушки, неизмельченный (образец 2); в – после сушки, измельченный в порошок (образец 3)

Таблица 2

Физико-химические показатели мякоти яблок и сырых яблочных выжимок

| Наименование показателя | Мякоть яблока | СПССК «Хвалынский сад» | О.В. Перфилова (2017) |
|--|---------------|------------------------|-----------------------|
| Массовая доля влаги, % | 86,30 | 79,60 | 81,60 |
| Массовая доля жира | 0,40 | 0,20 | 1,30 |
| Массовая доля азота, % | - | 0,19 | - |
| Массовая доля сырого протеина, % | 0,40 | 1,19±0,38 | 0,70 |
| Массовая доля сахара, % | 9–10 | 8,13 | 9,10 |
| Массовая доля титруемых кислот, ммольН1 /100 г | 0,80 | 3,40 | 0,90 |
| Массовая доля сырой клетчатки, % | 0,80–1,00 | 1,20 | 1,80 |

Примечание: «-» данный показатель не указан у авторов

Приведенные данные в таблице 2 показывают, что содержание сухих веществ в исследуемых сырых яблочных выжимках составляют 20,40%, из них 8,13% приходится на сахара; при этом данные значения вполне сопоставимы и с мякотью яблок и другими яблочными выжимками.

Представленные яблочные выжимки являются ценным источником пищевых волокон, например, отмечено содержание клетчатки 1,20%, в то время как в мякоти данный показатель варьирует от 0,8 до 1,0%.

В опытном образце яблочных выжимок отмечено низкое содержание жира по сравнению с мякотью яблок и другими выжимками, но при этом имеется высокое содержание сырого протеина и массовой доли титруемых кислот. Благодаря высокому содержанию сырого протеина 1,19±0,38% в опытных образцах яблочных выжимок обнаружена массовая доля азота 0,19%.

В таблице 3 представлены физико-химические показатели высушенных яблочных выжимок.

Физико-химические показатели высушенных яблочных выжимок

| Наименование показателя | СПССК «Хвалынский сад» | В.М. Коденцова (2023) | Перфилова О.В., Митрохин М.А. (2008) |
|---|------------------------|-----------------------|---|
| Массовая доля влаги, % | 6,90 | 4–10 | 6,00 |
| Массовая доля жира | 0,50 | 0,26–8,49 | 6,80 |
| Массовая доля азота, % | 0,62 | - | - |
| Массовая доля сырого протеина, % | 3,88±0,44 | 1,2–6,90 | 6,70 |
| Массовая доля сахара, % | 11,20 | - | 9,20 |
| Массовая доля титруемых кислот, ммольН1 /100 г | 24,00 | - | 0,90 |
| Массовая доля сырой клетчатки, % | 6,80±1,30 | - | 1,80 |

Примечание: «-» данный показатель не указан у авторов

После высушивания в дегидрататоре Ezidri Ultra FD1000 Digital, безусловно, содержание влаги, жира, азота изменяется в связи с удалением воды. Полученные результаты подтверждаются и данными литературы, которые варьируют в широком диапазоне и в значительной мере зависят от сорта яблок и от способа высушивания (табл. 3).

Массовая доля сырого протеина в опытных образцах сухих яблочных выжимок составила $3,88 \pm 0,44\%$; в свою очередь, данный показатель, согласно данным литературы, варьирует от 1,2–6,90%.

В опытных образцах высушенных яблочных выжимок массовая доля сахара была выше на 2% по сравнению

с данными, представленными О.В. Перфиловой и М.А. Митрохиным (2008) [5, 8].

Титруемая кислотность и массовая доля сырой клетчатки были выше в 26,67 раз и 3,78 раза по сравнению со сведениями, известными из литературы.

На рисунке 2 представлено содержание некоторых минеральных веществ в сырых яблочных выжимках.

Как видно из рисунка 2, после получения сока в сырых яблочных выжимках остается значительное количество фосфора и калия — 24,90 и 58,00 мг/100 г соответственно; при этом приведенные показатели выше данных литературы в среднем в 1,18 раз.

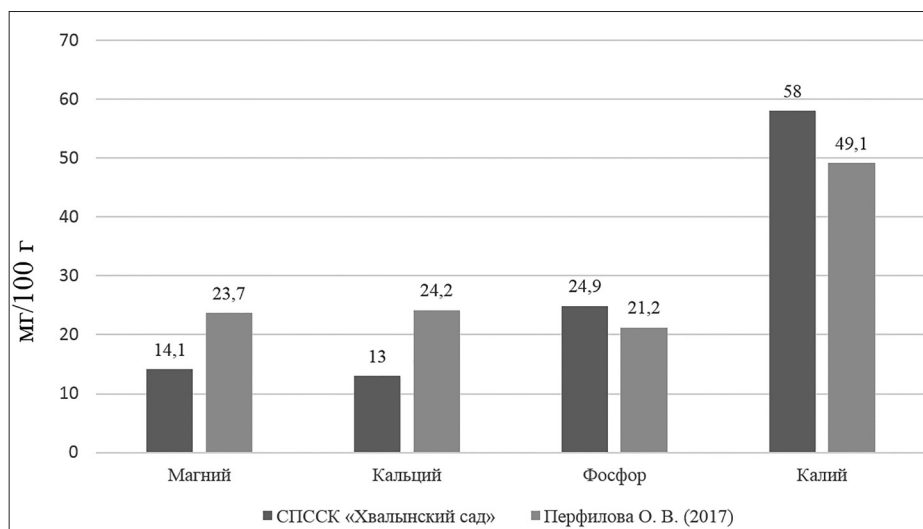


Рис. 2. Количественное содержание некоторых минеральных веществ в сырых яблочных выжимках

Также отмечено относительно низкое содержание магния и кальция (14,10 и кальция — 13,00 мг/100 г соответственно) по сравнению с цифрами О.В. Перфиловой (2017) — в среднем ниже на 1,77 раза, что, безусловно, связано с сортом яблок [9].

На рисунке 3 представлено количественное содержание некоторых минеральных веществ в сухих яблочных выжимках.

Как видно из рисунка 3, использование дегидрататора Ezidri Ultra FD1000 Digital для высушивания яблочных выжимок положительно повлияло на сохранность минеральных веществ опытных образцов от СПССК «Хвалынский сад». Такие утверждения основываются на сравнительном анализе с данными литературы.

По полученным экспериментальным данным, в представленных яблочных выжимках зафиксировано

высокое содержание кальция и фосфора — 2,12 и 2,29 мг/100 г соответственно. Эти показатели выше в 6,63 и 9,54 раза по сравнению с данными, представленными О.В. Перфиловой (2008) и Е.И. Рябининой (2022) [8, 13].

Из рисунка 3 видно, что содержание магния и калия в опытных образцах высушенных яблочных выжимок составило 0,29 и 0,53 мг/100 г соответственно, и они были выше в 3,97 и 6,63 раза по сравнению с данными литературы [8, 13].

На рисунке 4 представлены полученные сведения о содержании витамина С в сырых яблочных выжимках.

Установлено, что в изучаемых сырых яблочных выжимках содержание витамина С составило 23,70 мг/100 г, что вполне сопоставимо с мнением ряда авторов [5].

Содержание витамина С в яблочных выжимках после высушивания в дегидрататоре представлено на рисунке 5.

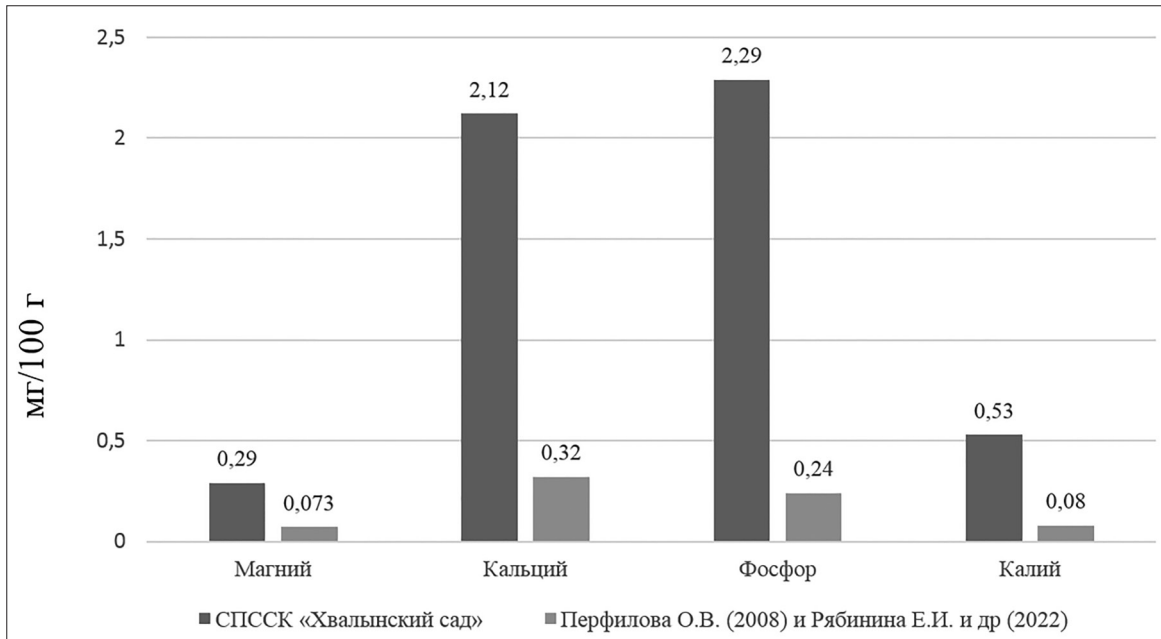


Рис. 3. Количественное содержание некоторых минеральных веществ в сухих яблочных выжимках

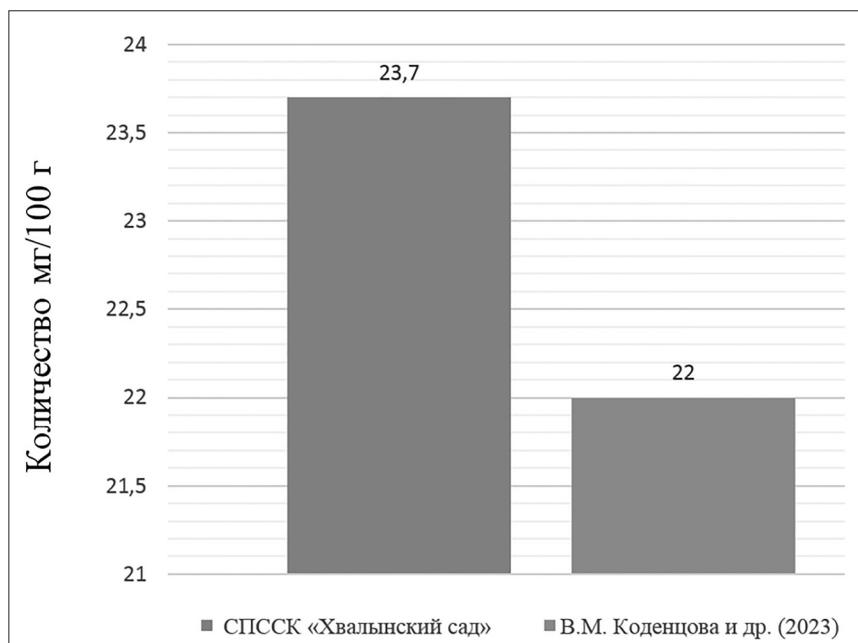


Рис. 4. Содержание витамина С в сырых яблочных выжимках

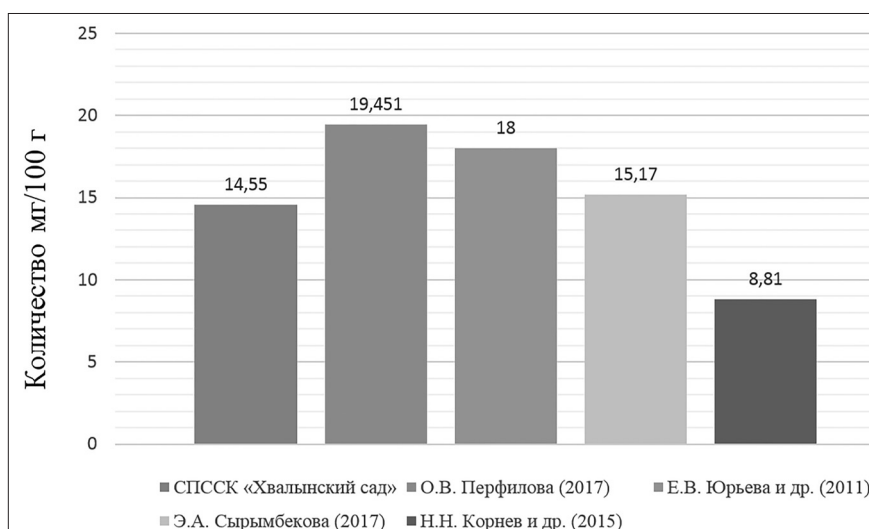


Рис. 5. Содержание витамина С в яблочных выжимках после высушивания в дегидрататоре

Уровень витамина С после высушивания в дегидрататоре «Ezidri Ultra FD1000 Digital» составил 14,55 мг/100 г, отображенный на рисунке 5, является относительно средним значением по сравнению с данными литературы, в которых этот показатель равен от 8,81 мг/100 г до 19,451 мг/100 г. На это влияют сезонность, сорт и тип высушивания яблок [9, 6, 7, 16, 17].

Согласно методическим рекомендациям, в ряде продуктов из растительного сырья рекомендуется определять биокомпоненты. По мнению ряда ученых, биокомпоненты — это остаток биологически активных веществ в жмыхе. Были проведены исследования по определению биокомпонентов по методу, описанному [4] (табл. 4).

Таблица 4

Содержание биокомпонентов в яблочных выжимках

| Наименование образца | Количество, (п 10) |
|-----------------------------|--------------------|
| Сырые яблочные выжимки | 2,51 |
| Высушенные яблочные выжимки | 1,82 |

Данные, представленные в таблице 4 по содержанию биокомпонентов в сырых яблочных выжимках, равны 2,51, а после высушивания — 1,82, то есть в процессе высушивания потери составили 27,49%.

Установлено, что изучаемые яблочные выжимки содержат значительное количество микронутриентов как в сыром, так и сушеном виде.

Заключение

Таким образом, яблочные выжимки, являющиеся вторичными отходами, по своему химическому составу

(содержание пищевых волокон и соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, обозначаемых как антиоксидантные пищевые волокна) имеют достаточный потенциал для применения в пищевой промышленности.

Относительно низкая стоимость и доступность в больших количествах делают представленный объект в виде яблочных выжимок перспективным сырьем для пищевой промышленности.

Авторы пришли к следующим выводам:

1. Определены органолептические и физико-химические показатели качества яблочных выжимок.
2. Установлено, что изучаемые яблочные выжимки содержат значительное количество микронутриентов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Литература

1. Алабугин А.А., Топузов Н.К. Принципы формирования механизма ресурсосбережения // Вестник Челябинского государственного университета. — 2015. — № 29. — С. 11–13.
2. Беликова А.Д., Обухова Л.Ю. Переориентация России в сторону Китая // Экономика и социум. — 2016. — № 2(21). — С. 84–85.
3. Богомолова И.П., Кривенко Е.И., Кочарьян А.Г., Тигранян В.Ж. Применение ресурсоэффективных технологий в рамках бережливого управления отраслевыми предприятиями // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. — 2020. — Т. 82. — № 4. — С. 418–423.

4. Динамическая биохимия: учебное пособие по выполнению лабораторных работ для направления подготовки 19.03.02 Продукты питания из растительного сырья; 19.03.03 Продукты питания животного происхождения; 19.03.04 Технология продукции и организации общественного питания; и специальности 36.05.01 Ветеринария. Сост.: Л.Г. Ловцова, О.С. Ларионова, П.В. Смутнев, Е.Г. Жничкова // ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ». — Саратов: ООО «Амирит», 2016. — 136 с.
5. Коденцова В.М., Рисник Д.В., Серба Е.М. и др. Яблочные выжимки как источник функциональных пищевых ингредиентов: обзор предметного поля // Хранение и переработка сельхозсырья. — 2023. — № 2. — С. 231–242.
6. Корнев Н.Н., Лисовой В.В., Купин Г.А., Матвиенко А.Н. Разработка технологии производства пищевой добавки из вторичных ресурсов переработки яблок // Пищевая промышленность. — 2015. — № 11. — С. 36–124.
7. Корнев Н.Н., Лукьяненко М.В., Шахрай Т.А. Антиоксидантная активность пищевых добавок, полученных из вторичных растительных ресурсов // Научный журнал КубГАУ. — 2017. — № 126(02). — С. 1–10.
8. Перфилова О.В., Митрохин М.А. Использование порошков из плодоовощных выжимок с целью расширения ассортимента мучных кондитерских изделий // Достижения науки и техники АПК. — 2008. — № 8. — С. 48–50.
9. Перфилова О.В. Яблочные выжимки как источник биологически активных веществ в технологии продуктов питания // Новые технологии. — 2017. — № 4. — С. 65–71.
10. Положихина М.А. Возможности и проблемы импортозамещения (на примере производства яблок) // Вестник Московского университета. Серия 6: Экономика. — 2022. — № 4. — С. 80–96.
11. Попов В.С., Смятская Ю.А. Модифицированный титриметрический метод количественного определения витамина С в окрашенных растительных экстрактах // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. — 2020. — № 4. — С. 43–53.
12. Резго Г.Я., Аверьянова С.Е. Формирование российского рынка фруктов и орехов в условиях экономических санкций // Торгово-экономический журнал. — 2017. — Т. 4. — № 1. — С. 21–34.
13. Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Пелешенко Е.И., Насонова Е.С. Использование яблочного порошка в лечебно-профилактических целях // Прикладные информационные аспекты медицины. — 2022. — Т. 25. — № 3. — С. 91–96.
14. Статическая биохимия: методические указания по выполнению лабораторных работ для направления подготовки 260200.62 Продукты питания животного происхождения; 260100.62 Продукты питания из растительного сырья; 260800.62 Технология продукции и организация общественного питания; и специальности 111801.65 Ветеринария. Сост.: Л.Г. Ловцова, О.С. Ларионова, П.В. Смутнев // ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ». — Саратов: ИЦ «Наука», 2015. — 187 с.
15. Сушилка Ezidri. Официальный сайт. Электронный источник. Режим доступа: <https://ezidri.ru>.
16. Сырымбекова Э.А. Получение и исследование свойств яблочного порошка // Известия Кыргызского государственного технического университета им. И. Раззакова. — 2017. — № 3(43). — С. 35–38.
17. Юрьева Е.В., Бабушкин В.А., Негреева А.Н. Использование сухих яблочных выжимок в подкормке поросят-сосунков и рационе отъемышей // Достижения науки и техники АПК. — 2011. — № 8. — С. 58–60.
18. Bogomolova I.P., Krivenko E.I., Larionova A.A., Eroshenko V.I. et al. The role and features of resource-saving processes in modern conditions of managing the national economy and the implementation of state strategic initiatives // Journal of Environmental Treatment Techniques. — 2019. — Vol. 7. — No. 3. — P. 425–431.
19. Jalal A.Q., Allalaq H.A.E., Shinkevich A.I., Kudryavtseva S.S., et al. Assessment of the efficiency of energy and resourcesaving technologies in open innovation and production systems // International Journal of Energy Economics and Policy. — 2019. — Vol. 9. — No. 5. — P. 289–296.

References

1. Alabugin AA, Topuzov NK. Printsipy formirovaniya mekhanizma resursosberezheniya. Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta 2015; 29:11–13 (in Russian).
2. Belikova AD, Obukhova LYu. Pereoriyentatsiya Rossii v storonu Kitaya. Ekonomika i sotsium 2016; 2(21):84–85 (in Russian).
3. Bogomolova IP, Krivenko YeI, Kochar'yan AG, Tigranyan VZh. Primeneniye resursoeffektivnykh tekhnologiy v ramkakh berezhlivogo upravleniya otraslevymi predpriyatiyami. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologiy 2020; 82(4):418–423 (in Russian).
4. Dinamicheskaya biokhimiya: uchebnoye posobiye po vypolneniyu laboratornykh rabot dlya napravleniya podgotovki 19.03.02 Produkty pitaniya iz rastitel'nogo syr'ya; 19.03.03 Produkty pitaniya zhivotnogo proiskhozhdeniya; 19.03.04 Tekhnologiya produktsii i organizatsii obshchestvennogo pitaniya; i spetsial'nosti 36.05.01 Veterinariya. Sost: LG Lovtsova, OS Larionova, PV Smutnev, YeG Zhnichkova. FGBOU VO «Saratovskiy GAU». Saratov: ООО «Amirit», 2016: 136 (in Russian).
5. Kodentsova VM, Risnik DV, Serba YeM i dr. Yablochnyye vyzhimki kak istochnik funktsional'nykh pishchevykh ingredi-entov: obzor predmetnogo polya. Khraneniye i pererabotka sel'khozsyrya 2023; 2:231–242 (in Russian).
6. Kornev NN, Lisovoy VV, Kupin GA, Matviyenko AN. Razrabotka tekhnologii proizvodstva pishchevoy dobavki iz vtorichnykh resursov pererabotki yablok. Pishchevaya promyshlennost' 2015; 11:36–124 (in Russian).

7. Kornev NN, Luk'yanenko MV, Shakhray TA. Antioxidantnaya aktivnost' pishchevykh dobavok, poluchennykh iz vtorichnykh rastitel'nykh resursov. Nauchnyy zhurnal Kub-GAU 2017; 126(02):1–10 (in Russian).
8. Perfilova OB, Mitrokhin MA. Ispol'zovaniye poroshkov iz plodoovoshchnykh vyzhimok s tsel'yu rasshireniya assortimenta muchnykh konditerskikh izdeliy. Dostizheniya nauki i tekhniki APK 2008; 8:48–50 (in Russian).
9. Perfilova OV. Yablochnyye vyzhimki kak istochnik biologicheskii aktivnykh veshchestv v tekhnologii produktov pitaniya. Novyye tekhnologii 2017; 4:65–71 (in Russian).
10. Polozhikhina MA. Vozmozhnosti i problemy importozameshcheniya (na primere proizvodstva yablok). Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 6: Ekonomika 2022; 4:80–96 (in Russian).
11. Popov VS, Smyatskaya YuA. Modifitsirovannyi titrimetricheskii metod kolichestvennogo opredeleniya vitamina C v okrashennykh rastitel'nykh ekstraktakh. Vestnik Permskogo natsional'nogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Khimicheskaya tekhnologiya i biotekhnologiya 2020; 4:43–53 (in Russian).
12. Rezzo GYa, Aver'yanova SYe. Formirovaniye rossiyskogo rynka fruktov i orekhov v usloviyakh ekonomicheskikh sanktsiy. Torgovo-ekonomicheskii zhurnal 2017; 4(1):21–34 (in Russian).
13. Ryabinina YeI, Zotova YeYe, Peleshenko YeI, Nasonova YeS. Ispol'zovaniye yablochnogo poroshka v lechbeno-profilakticheskikh tselyakh. Prikladnyye informatsionnyye aspekty meditsiny 2022; 25(3):91–96 (in Russian).
14. Statischeckaya biokhimiya: metodicheskiye ukazaniya po vypolneniyu laboratornykh rabot dlya napravleniya podgotovki 260200.62 Produkty pitaniya zhivotnogo proiskhozhdeniya; 260100.62 Produkty pitaniya iz rastitel'nogo syr'ya; 260800.62 Tekhnologiya produktsii i organizatsiya obshchestvennogo pitaniya; i spetsial'nosti 111801.65 Veterinariya. Sost: LG Lovtsova, OS Larionova, PV Smutnev. FGBOU VO «Saratovskiy GAU». Saratov: ITS «Nauka», 2015: 187 (in Russian).
15. Sushilka Ezidri. Ofitsial'nyy sayt. Elektronnyy istochnik. Rezhim dostupa: <https://ezidri.ru> (in Russian).
16. Syrymbekova EA. Polucheniye i issledovaniye svoystv yablochnogo poroshka. Izvestiya Kyrgyzskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta im I Razzakova 2017; 3(43):35–38 (in Russian).
17. Yur'yeva YeV, Babushkin VA, Negreyeva AN. Ispol'zovaniye sukhikh yablochnykh vyzhimok v podkormke porosyat-sosunkov i ratsione ot'yemyshey. Dostizheniya nauki i tekhniki APK 2011; 8:58–60 (in Russian).
18. Bogomolova IP, Krivenko EI, Larionova AA, Eroshenko VI et al. The role and features of resource-saving processes in modern conditions of managing the national economy and the implementation of state strategic initiatives. Journal of Environmental Treatment Techniques 2019; 7(3):425–431.
19. Jalal AQ, Allalaq HAE, Shinkevich AI, Kudryavtseva SS, et al. Assessment of the efficiency of energy and resourcesaving technologies in open innovation and production systems. International Journal of Energy Economics and Policy 2019; 9(5):289–296.

STUDY OF QUALITY INDICATORS OF APPLE POMACE

B.M. NURGALIEVA, K.E. BELOGLAZOVA, G.E. RYSMUKHAMBETOVA, L.G. LOVTSOVA

Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov

It is known from literary data that dry apple pomace contains a fairly large amount of nitrogen-free extractive substances (44.5%), sugar (6.18%), fiber (28.8%) and pectin (up to 18%). The protein content is relatively small (8.09%), but the protein is highly valuable. The aim of the work was to study some quality indicators of apple pomace obtained in the SPSSK «Khvalynsky Sad» (Russian Federation) from apples of the Berkutovskoye variety. It was found that the presented apple pomace was a valuable source of dietary fiber, e.g. the fiber content was 1.20%, while this indicator varied from 0.8 to 1.0% in the pulp. Due to the high content of crude protein ($1.19 \pm 0.38\%$), the mass nitrogen fraction of 0.19% was found in the experimental samples of apple pomace. The mass fraction of crude protein in the experimental samples of dry apple pomace was $3.88 \pm 0.44\%$, in turn, this indicator, according to literary data, varies within 1.2–6.90%. According to the experimental data obtained, the presented apple pomace had a high content of calcium and phosphorus: 2.12 and 2.29 mg/100 g, respectively. Thus, it can be said that due to its composition (high content of crude fiber and protein, which have antioxidant properties), the presented apple pomace can have a pleiotropic cardioprotective and vasculoprotective effect, affecting numerous signaling pathways and risk factors. As a result of our studies, the rich nutrient potential of apple pomace was determined. The possibility of using this secondary fruit and vegetable raw material not only as a feed base, but also for the design of new food products was shown.

Keywords: apple pomace, secondary raw materials, food waste, physicochemical indicators, quality indicators, organoleptic indicators, dehydrator, vitamin C, biocomponents.

Address:

Beloglazova K.E., Ph.D. in Agricultural Sciences
Assistant of the Department of Food Technology, Vavilov University
E-mail: k.beloglazova@yandex.ru

Для цитирования:

Нургалиева Б.М., Белоглазова К.Е., Рысмукхамбетова Г.Е., Ловцова Л.Г. Изучение показателей качества яблочных выжимок. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):34–42.

For citation:

Nurgalieva B.M., Beloglazova K.E., Rysmukhambetova G.E., Lovtsova L.G. Study of quality indicators of apple pomace. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4): 34–42 (in Russian).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БЫТОВЫХ ФИЛЬТРОВ ДЛЯ ДООЧИСТКИ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ

С.С. КУРМАНОВА*, А.С. БАРАНОВА, В.А. ЛАХНО, О.Н. ПОСТНИКОВА

*Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт им. С.И. Георгиевского,
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь*

В работе выявлено, что вода из централизованной системы водоснабжения до применения бытового фильтра и после его первого применения полностью соответствует требованиям СанПиН 1.2.2685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». После повторного (второго) исследования, после доочистки, ОМЧ фильтрованной воды составляет более 50 КОЕ/см³, что не соответствует гигиеническим требованиям и может быть связано с неправильной эксплуатацией картриджа (поскольку все исследования проводились на одном картридже). Питьевая вода, отобранная как из скважины, так и из колодца, не соответствует требованиям СанПиН по наличию обобщенных колиформных показателей и энтерококков: вместо очистки, получается «обратный эффект» — загрязнение. То есть, при исследовании воды из фильтра-кувшина нами были обнаружены несоответствия между заявленными в технических условиях результатами и фактически полученными.

Ключевые слова: питьевая вода, доочистка, бытовые фильтры, санитарно-бактериологические исследования, микробиологические исследования, эффективность.

Введение

Вода как среда обитания человека является одним из основных путей поступления макро- и микроэлементов, способствует соблюдению необходимых физиологических процессов и гигиенических навыков, но может быть фактором передачи ряда заболеваний. Как указано в Государственном докладе Роспотребнадзора: «В 2023 году в структуре заболеваемости всего населения Российской Федерации, ассоциированной с неудовлетворительным качеством питьевой воды, приоритетные позиции занимали: болезни органов пищеварения — 33,7% (477,3 тыс. сл.); болезни мочеполовой системы — 25,8% (366,2 тыс. сл.); болезни кожи и подкожной клетчатки — 12,6% (178,5 тыс. сл.); болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ — 10,0% (141,0 тыс. сл.); болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм — 6,5% (91,8 тыс. сл.)» [9, с. 139].

По данным Роспотребнадзора, качество питьевой воды в последние годы заметно улучшилось в результате проводимых надзорных и технических мероприятий как непосредственно в источниках централизованного водоснабжения, так и в распределительной сети: «...Доля проб, не соответствующих гигиеническим нормативам по санитарно-химическим показателям, снизилась с 27,31% до 24,60%, по микробиологическим показателям — с 4,70% до 3,79%» [9, с. 27]; в сети — «...В 2023 году по сравнению с 2014 годом наблюдается снижение доли проб воды, не соответствующих гигиеническим нормативам по санитарно-химическим показателям, с 15,48% до 12,00%, по микробиологическим показателям с 3,73% до 2,60% и рост по паразитологическим показателям с 0,08% до 0,10%» [9, с. 30].

Роспотребнадзором в рамках исполнения федерального проекта «Чистая вода» осуществляется информирование органов власти и граждан о качестве питьевой воды «... посредством создания информационной системы «Интерактивная карта контроля качества питьевой воды в Российской Федерации» [9, с.37]. Проводится замена изношенных труб водопроводов, совершенствуются методы первичной обработки питьевой воды, методы санитарно-биологических исследований воды, например, «... за счет использования фильтрующих материалов, эффективных по извлекаемости микроорганизмов из воды, и современных методов их детекции,

© 2024 г. Курманова С.С., Баранова А.С., Лахно В.А., Постникова О.Н.

* **Автор для переписки:**

Курманова Сабина Сейрановна

студентка 3 курса 1-го медицинского факультета ОТКЗ Медицинский институт им. С.И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» Россия, г. Симферополь

E-mail: kurmanova_05@bk.ru

повысит оценку качества воды по микробиологическим критериям, будет способствовать снижению рисков водного пути передачи кишечных патогенов и минимизации заболеваемости населения острыми кишечными инфекциями» [6, с. 3].

Учитывая важность качества воды для нашей жизнедеятельности, современные авторы указывают на необходимость «повышения требований к лабораторному контролю качества воды в стационарных и полевых условиях, при чрезвычайных ситуациях, отсутствие новых практических и теоретических исследований о пробоподготовке воды методом мембранной фильтрации, недостаток информации о материалах фильтрующих мембран и факторах, влияющих на результаты извлечения бактерий и концентрирования вирусов из воды, а также их детекции...» [6, с. 4]; они предлагают проводить доочистку питьевой воды в бытовых условиях с помощью фильтров. «Доочистка питьевой воды фильтрами «Барьер» и «Аквафор» способствовала улучшению качества воды по органолептическим показателям, снижению общей жесткости и ионов кальция до нормативных значений, концентрация тяжелых металлов в воде уменьшается на 10,5–2,5%, но содержание марганца и железа в воде после доочистки превышает ПДК» [4, с. 46; 5, 7, 8].

По нашему мнению, существующие фильтры для доочистки питьевой воды кувшинного типа со сменными картриджами действительно улучшают органолептические показатели за счет улучшения вкуса воды, снижают содержание ряда токсикантов (ртуть, хлор, пестициды и т.д.), но не улучшают качество питьевой воды по микробиологическим показателям, что подтверждается отсутствием информации в эксплуатационной характеристике на сменные картриджи.

Целью настоящей работы явилось изучение качества доочистки питьевой воды по санитарно-бактериологическим показателям с помощью бытовых фильтров и микробиологическая оценка эффективности фильтров для доочистки питьевой воды в разных источниках водоснабжения.

Материалы и методы

С целью изучения информированности молодежи, обучающейся в образовательных организациях Республики Крым и города федерального значения Севастополя, об актуальности использования фильтров для очистки воды, нами была разработана анкета, состоящая из 12 вопросов, и проведено анкетирование в формате Google Forms.

Далее в рамках исследования был проведен отбор проб питьевой воды из трех источников водоснабжения на санитарно-бактериологические показатели — из системы централизованного водоснабжения и децентрализованного (артезианская скважина и шахтный колодец). Микробиологические исследования воды проводились до и после применения бытовых фильтров.

Исследования питьевой воды осуществлялись на базе микробиологической лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Гигиеническая оценка питьевой воды до и после ее доочистки с помощью бытовых фильтров проводилась на кафедре гигиены общей с экологией медицинского института.

Программа исследований состояла из двух этапов. На первом этапе нами была изучена действующая нормативная документация, касающаяся методов отбора питьевой воды, технологии проведения микробиологических исследований, оценка качества питьевой воды по основным санитарно-бактериологическим показателям.

Второй этап исследований предусматривал продолжение проведения исследований питьевой воды на дополнительные санитарно-бактериологические показатели, проведения исследований на паразитологические показатели качества воды и исследования воды после применения других методов доочистки, например — фильтров с обратным осмосом.

В ходе исследования использовались методы, широко применяемые в практической бактериологии по подготовке и непосредственному проведению исследований проб, методы гигиенической оценки результатов исследований, статистические методы.

Отбор проб питьевой воды из централизованных сетей водоснабжения осуществлялся в соответствии с требованиями ГОСТ Р 59024-2020. Национальный стандарт Российской Федерации. Вода. Общие требования к отбору проб» — для сопоставления полученных результатов с показателями, регламентированными в нормативных документах; ГОСТ Р 56237-2014 (ИСО 5667-5:2006). Национальный стандарт Российской Федерации. Вода питьевая — с целью определения контроля качества воды в распределительной системе; ГОСТ 31942-2012 «Вода. Отбор проб для микробиологического анализа» — проводился непосредственно отбор проб [1–3].

Отбор проб питьевой воды из централизованных сетей (микробиологическая лаборатория мединститута), скважины и колодца делался в асептических условиях:

в стерильные стеклянные бутылки емкостью 500 см³, в стерильных перчатках. Бутылки закрывались плотно закрывающимися резиновыми пробками.

Стерильные емкости открывались непосредственно перед отбором проб, емкости закрывались герметично и не намокали при транспортировке в лабораторию.

Перед отбором проб воды из централизованного источника осуществлялась механическая обработка крана (мытьё со щеткой и дезинфектантами), слив воды, а непосредственно перед отбором — кран стерилизовали с помощью горящего тампона, смоченного 96%-ным этиловым спиртом.

Открытую емкость (бутылку) для отбора проб помещали под кран непосредственно в струю воды и заполняли ее, избегая контакта поверхности крана с бутылкой, что соответствует требованиям ГОСТ 31942 [3, с. 5].

Отбор проб воды из колодца и из скважины проводился без предварительного спуска воды, но с дезинфекцией поверхности крана 96%-ным этиловым спиртом [3, с. 6], для подъема воды был установлен стационарный насос. Пробы воды отбирались в самом начале откачки воды [3, с. 7].

Транспортировка проб осуществлялась в продезинфицированных термоконтейнерах, причем, крышки которых не соприкасались с пробками бутылок [3, с. 9]. Доставка в микробиологическую лабораторию занимала от 10 до 90 минут.

Микробиологические исследования проб питьевой воды проводились с применением бродильного метода и метода мембранных фильтров.

В ходе исследования применялся статистический анализ полученных результатов.

Результаты и обсуждение

Нашей промышленностью для организации доочистки питьевой воды выпускаются стационарные системы, насадки на водопроводные краны и фильтры кувшинного типа.

В торговой сети Республики Крым представлен значительный ассортимент производственных и бытовых систем доочистки питьевой воды («Барьер», «Гейзер», «Аквафор» и другие), выбор возложен на покупателя, который не всегда четко ориентируется при подборе необходимой системы доочистки.

Самой бюджетной формой, пользующейся спросом у населения, являются кувшинные фильтры и фильтры-трио, которые устанавливаются на домашних кухнях обычно под мойкой.

Картриджи к кувшинные фильтры, как правило, выпускаются согласно ТУ 3697-039-32989981-02, ТУ 3697-023-11139511-2013; на проектную документацию имеется санитарно-эпидемиологическое заключение учреждений Роспотребнадзора Российской Федерации.

В основном все фильтры предназначены для уменьшения жесткости питьевой воды, улучшения ее органолептических показателей, а микробиологические показатели и эпидемиологическая безопасность на этикетках этих фильтров не отражаются. В инструкции по смене картриджа, нанесенной на упаковке, нет данных о правильной эксплуатации картриджа. Например, сколько воды должно быть в кувшине или сколько времени можно пользоваться данной водой после фильтрации. Только за редким исключением в некоторых инструкциях имеется запись «Своевременно заменяйте модули в вашем водоочистителе» или «Если вы сомневаетесь в бактериальной безопасности исходной воды, после фильтрации воду необходимо прокипятить» (продолжительность кипячения не указывается).

Осведомленность молодежи по применению в быту систем доочистки питьевой воды изучали с помощью анкетирования. В опросе приняли участие 125 человек, из них юношей 21,6%, девушек — 78,4%. Из всех респондентов большую часть составили студенты, из них: 33,6% — студенты 1–2 курсов медицинского института, 27,2% — студенты других вузов Крыма, работающая молодежь — 33,6%, другие категории (n=7) — учащиеся образовательных организаций среднего образования и пенсионеры.

Из всех опрошенных 84 (62,7%) респондентов ответили, что регулярно пользуются фильтрами для очистки воды, 30 (24%) — не пользуются, а 11 опрошенных (8,8%) ответили, что «иногда» применяют их. Как показал опрос, 61,41% опрошенных неправильно эксплуатируют сменные картриджи, из них: 17,1% респондентов не контролируют своевременность замены, 23,81% — контролируют «не всегда», а 20,5% — вообще не контролируют.

Вместе с тем большая часть опрошенных (90,4%) считает использование фильтров необходимым. Неправильная эксплуатация и несвоевременная замена картриджей не могут гарантировать потребителям качественную и безопасную воду, особенно в эпидемиологическом отношении, что может привести к осложнению эпидемиологической ситуации.

Нами изучалось качество питьевой воды, исследованной из источников централизованного и нецентрализованного водоснабжения города Симферополя, отобранных

параллельно из сети и после проведения доочистки воды с помощью бытового фильтра-кувшина типа «Барьер».

После проведения лабораторных исследований нами проведена гигиеническая оценка полученных результатов в соответствии с требованиями табл. 3.5 и 3.6 «Основные санитарно-микробиологические и паразитологические показатели питьевой воды» СанПиН 1.2.2685-21 «Гигиенические нормативы и требования

к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания» [10].

Несмотря на то, что на этикетке отсутствуют данные о микробиологической безопасности воды после ее очистки, нами было реализовано исследование воды до и после очистки на основные санитарно-микробиологические показатели; результаты исследований представлены ниже (табл. 1 и 2).

Таблица 1

Основные санитарно-микробиологические показатели питьевой воды из системы централизованного водоснабжения до и после доочистки

| № п/п | Показатели | Нормативы [10, с. 226] | Фактически | | |
|-------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | | до очистки | после доочистки | |
| | | | | 1-е исследование | 2-е исследование |
| 1 | Общее микробное число (ОМЧ) | не более 50 КОЕ/см ³ | 0 КОЕ/см ³ | 0 КОЕ/см ³ | более 50 КОЕ/см ³ |
| 2 | Обобщенные колиформные показатели | отсутствие КОЕ/см ³ | отсутствие КОЕ/см ³ | отсутствие КОЕ/см ³ | отсутствие КОЕ/см ³ |
| 3 | Энтерококки | отсутствие КОЕ/см ³ | отсутствие КОЕ/см ³ | отсутствие КОЕ/см ³ | отсутствие КОЕ/см ³ |

Из таблицы 1 видно, что вода из централизованной системы водоснабжения до очистки в бытовом фильтре и после очистки (1-е исследование) в плане наличия «микробного пейзажа» чистая и не представляет эпидемиологической опасности. При повторном исследовании через 7 дней вода во втором исследовании имеет ОМЧ более 50 КОЕ/см³, обобщенные колиформные показатели и энтерококки отсутствуют.

Таким образом, вода из централизованной системы водоснабжения до применения бытового фильтра и после его первого применения полностью соответствует требованиям СанПиН 1.2.2685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». После повторного (второго) исследования, после доочистки, ОМЧ фильтрованной воды составляет более 50 КОЕ/см³, что не соответствует гигиеническим требованиям и может быть связано с неправильной эксплуатацией картриджа,

поскольку все исследования проводились на одном картридже.

Можно предположить, что внутреннее содержимое картриджа не обеспечивает очистку питьевой воды от микроорганизмов, а напротив, служит «питательной средой» для их развития. Применение бытовых кувшинных фильтров не может обеспечить эпидемиологическую безопасность питьевой воды, поэтому в некоторых инструкциях для потребителей производитель указывает на необходимость кипячения профильтрованной воды. Считаем данный факт недопустимым в обеспечении населения водой надлежащего качества в эпидемиологическом отношении, производителям картриджей необходимо обратить особое внимание на доочистку питьевой воды не только по физико-химическим показателям, но и по микробиологическим, и вполне возможно — по паразитологическим (нами данное исследование будет проведено позже).

Таблица 2

Основные санитарно-микробиологические показатели питьевой воды из системы децентрализованного водоснабжения до и после доочистки

| № п/п | Показатели | Нормативы [10, с. 226] | Фактически | | | | | |
|-------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | Вода из скважины | | | Вода из колодца | | |
| | | | до очистки | после доочистки | | до очистки | после доочистки | |
| | | | | 1 иссл. | 2 иссл. | | 1 иссл. | 2 иссл. |
| 1 | Общее микробное число | не более 100 КОЕ/см ³ | 0 КОЕ/см ³ | более 50 КОЕ/см ³ | более 50 КОЕ/см ³ | 6 КОЕ/см ³ | более 50 КОЕ/см ³ | более 50 КОЕ/см ³ |

| | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 2 | Обобщенные колиформные показатели | отсутствие КОЕ/см ³ | 0 КОЕ/см ³ | | | 17 КОЕ/см ³ | 17 КОЕ/см ³ | 19 КОЕ/см ³ |
| 3 | Энтерококки | отсутствие КОЕ/см ³ | 0 КОЕ/см ³ | единичные | единичные | единичные | единичные | отсутствие КОЕ/см ³ |

Из таблицы 2 видно, что питьевая вода, отобранная как из скважины, так и из колодца, не соответствует требованиям СанПиН по наличию обобщенных колиформных показателей и энтерококков: вместо очистки получается «обратный эффект» — загрязнение. То есть, при исследовании воды из фильтра-кувшина нами были обнаружены несоответствия между заявленными в технических условиях результатами и фактически полученными.

Согласно «Научно-исследовательскому отчету о проведении испытаний», «Кассета «Барьер жесткость х 2» продемонстрировала наибольшую эффективность очистки от общей жесткости, в особенности после 200 л (в сравнении с другими кассетами). Снижение эффективности в течение ресурса проходило плавно, без значительных колебаний» [8, с. 9].

По существующим техническим характеристикам сменных картриджей и данным отчета [8], мы не можем судить о «микробиологической эффективности» очистки питьевой воды. Что же касается собственных исследований, то полученные результаты свидетельствуют об отсутствии такой эффективности, поскольку имеет место «обратный эффект» — загрязнение питьевой воды в ходе очистки.

Заключение

Таким образом, полученные нами данные предварительны и требуют проведения дополнительных исследований в плане увеличения количества исследований, расширения показателей исследования, то есть исследовать воду не только на основные показатели, но и дополнительные. Также необходимо вместо кувшинных фильтров проверить эффективность микробиологической доочистки воды с помощью систем обратного осмоса, поскольку в потребительских инструкциях производители указывают на очистку воды от микроорганизмов.

Для обеспечения населения доброкачественной питьевой водой с помощью применения систем доочистки (бытовые фильтры) считаем целесообразным изменить действующую систему выпуска и реализации сменных модулей:

- при производстве картриджей предусмотреть очистку воды от микробиологических загрязнителей;

- в инструкцию пользователям добавить данные о режиме пользования картриджем (сколько воды должно быть в кувшине, сколько времени можно ею пользоваться и т.д.);

- осуществлять продажу картриджей в специализированных отделах магазинов, где картридж можно подобрать в зависимости от результатов исследования воды (возможно проведение экспресс-исследований);

- разработать для потребителей инструкцию по применению систем доочистки, в зависимости от результатов исследований воды;

- проводить замену картриджей с учетом сдачи использованных и т.д.

Литература

- ГОСТ 31942-2012 Вода. Отбор проб для микробиологического анализа URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/53467/> (Дата обращения: 13.07.2024).
- ГОСТ Р 56237-2014 (ИСО 5667-5:2006). Национальный стандарт Российской Федерации. Вода питьевая. Отбор проб на станциях водоподготовки и в трубопроводных распределительных системах. URL: <https://gostassistant.ru/search?q=ГОСТ%20Р%2056237%24> (Дата обращения: 13.07.2024).
- ГОСТ Р 59024-2020. Национальный стандарт Российской Федерации. Вода. Общие требования к отбору проб. URL: <https://gostassistant.ru/doc/7365e3e0-aa58-4b6b-9809-880295ac4040> (Дата обращения: 13.07.2024).
- Дельцова В.А. Доочистка питьевой воды на примере бытовых фильтров // Молодые ученые — развитию Национальной технологической инициативы (Поиск). — Иваново. — 2021. — № 1. — С. 809–811.
- Дергачева Л.В. Методы доочистки воды в системе бытового водоснабжения // Сборник научных трудов IV Международной научно-практической конференции «Транспорт и логистика: пространственно-технологическая синергия развития, Ростов-на-Дону, 03–04 февраля 2020». — С. 66–70.
- Змеева Т.А. Повышение эффективности методов санитарно-микробиологических исследований воды с использованием современных мембранных технологий и способов детекции // Автореф. дис... канд. мед. наук. — Санкт-Петербург, 2017. — 24 с. URL: <https://gabrich.ru/files/pdf/zmeeva-avto.pdf> (Дата обращения: 07.07.2024).
- Мещерякова Г.В., Шакирова С.С. Применение бытовых фильтров для доочистки воды // Проблемы, перспективы

и направления инновационного развития науки: Сборник статей по итогам Международной научно-практической конференции. Ч. 4. 24 ноября 2017 г. — Омск, 2017. — С. 46—49.

8. Научно-исследовательский отчёт о проведении испытаний № ЛПИ К-070/22 от 04.05.2023. URL: https://www.barrier.ru/upload/NIO_LPI_K-070_22-1-17_fin.pdf (Дата обращения: 07.07. 2024).
9. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. — Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2024. — 364 с.
10. СанПиН 1.2.2685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/files/news/GN_sreda%20_obitaniya_compressed.pdf (Дата обращения: 13.07.2024).
4. Del'tsova VA. Doochistka pit'yevoy vody na primere bytovykh fil'trov. *Molodyye uchenyye — razvitiyu Natsional'noy tekhnologicheskoy initsiativy (Poisk)*. Ivanovo 2021; 1:809—811 (in Russian).
5. Dergacheva LV. Metody doochistki vody v sisteme bytovogo vodosnabzheniya. *Sbornik nauchnykh trudov IV Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Transport i logistika: prostranstvenno-tekhnologicheskaya sinergiya razvitiya, Rostov-na-Donu, 03—04 fevralya 2020»*. 66—70 (in Russian).
6. Zmeyeva TA. Povysheniye effektivnosti metodov sanitarnomikrobiologicheskikh issledovaniy vody s ispol'zovaniyem sovremennykh membrannykh tekhnologiy i sposobov detektsii. *Avtoref. dis... kand. med. nauk. St. Petersburg, 2017: 24*. URL: <https://gabruch.ru/files/pdf/zmeeva-avto.pdf> (Data of access: 07.07. 2024) (in Russian).
7. Meshcheryakova GV, Shakirova SS. Primeneniye bytovykh fil'trov dlya doochistki vody. *Problemy, perspektivy i napravleniya innovatsionnogo razvitiya nauki: Sbornik statey po itogam Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Ch. 4. 24 noyabrya 2017 g. Omsk, 2017: 46—49* (in Russian).
8. Nauchno-issledovatel'skiy otchot o provedenii ispytaniy № ЛПИ К-070/22 от 04.05.2023. URL: https://www.barrier.ru/upload/NIO_LPI_K-070_22-1-17_fin.pdf (Data of access: 07.07. 2024) (in Russian).
9. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2024. — 364 с (in Russian).
10. СанПиН 1.2.2685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания». URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/files/news/GN_sreda%20_obitaniya_compressed.pdf (Data of access: 13.07.2024) (in Russian).

References

MICROBIOLOGICAL EFFICIENCY OF HOUSEHOLD FILTERS FOR ADDITIONAL PURIFICATION OF DRINKING WATER

S.S. KURMANOVA, A.S. BARANOVA, V.A. LAKHNO, O.N. POSTNIKOVA

Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S.I. Georgievsky, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky», Simferopol

Drinking water is the main factor in the human environment, both before and after birth, and the entire process of life, including work. At the same time, water, in addition to its basic physiological and hygienic significance, has great epidemiological, including entomological and parasitological significance, since it can become a factor in the transmission of many human, animal and plant diseases. Whether water will be a source of life or a cause of ailments directly depends on its natural composition and quality. That is why special requirements are placed on the quality of drinking water, its hygienic and especially epidemiological significance, which is the most important preventive measure in terms of the prevention of many diseases and diseases. Post-treatment systems after traditional treatment at water treatment plants, in particular, filters that are widely used in everyday life, contribute to improving the quality of drinking water.

It is especially important when choosing a device for water purification, to study its performance characteristics and documents, because without proper operation, irreparable damage to health will be caused instead of benefit.

Keywords: drinking water, post-treatment, household filters, sanitary and bacteriological studies, microbiological studies, efficiency.

Address:

Kurmanova S.S.

3rd year student of the 1st medical faculty of the

ORBL Medical institute named after S.I. Georgievsky,

CFU named after V.I. Vernadsky Russia, Simferopol

E-mail: kurmanova_05@bk.ru

Для цитирования:

Курманова С.С., Баранова А.С., Лахно В.А., Постникова О.Н. Микробиологическая эффективность бытовых фильтров для доочистки питьевой воды. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):43–49.

For citation:

Kurmanova S.S., Baranova A.S., Lakhno V.A., Postnikova O.N. Microbiological efficiency of household filters for additional purification of drinking water. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4):43–49 (in Russian).

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПЛЮРОНИКА F68 НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

А.П. КУВЫРЧЕНКОВА^{1*}, Т.Н. ГОЛЕВА¹, А.Г. РОГОВ¹, М.А. ТРУНАЕВА²,
Н.Ю. ЛОТОШ¹, А.А. СЕЛИЩЕВА¹

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва;*

² *МИРЭА-Российский технологический университет,*

³ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва*

Методом динамического светорассеяния изучен процесс мицеллообразования плуроника F68 в воде, в фосфатно-солевом буфере и в среде для инкубации митохондрий. Для всех исследованных сред критическая концентрация мицеллообразования находится в интервале 0,1–0,3% по весу (или $2–4 \times 10^{-4} \text{M}$), что согласуется с ранее полученными данными. Однако процент образования мицелл размером 6–10 нм в среде с рН 7,2 (фосфатно-солевой буфер и среда инкубации митохондрий) значительно ниже, чем в воде. Инкубация плуроника F68 с митохондриями приводила к исчезновению мицелл, что может быть следствием как проникновения их в митохондрии, так и результатом адсорбции на митохондриальной поверхности. Исследовали влияние разных концентраций плуроника F68 на функциональные показатели митохондрий и скорость потребления кислорода при окислении различных субстратов. Показали, что плуроник F68 не влиял на скорость дыхания в состояниях 3 и 4, не снижал мембранный потенциал, не вызывал набухания митохондрий, не изменял скорость генерации перекиси водорода и не влиял на работу АТФ-синтазы. В концентрации 0,25% плуроник F68 обратимо открывал неспецифическую митохондриальную пору.

Ключевые слова: печень, митохондрии, плуроник F68, динамическое светорассеяние, крысы.

Введение

Полимер плуроник F68 (pluronic F68 или ролахатер) представляет собой синтетический триблок-сополимер, содержащий в среднем 25–30 гидрофобных остатков полипропиленоксида (РРО) и 75–80 гидрофильных остатков полиэтиленоксида (РЕО), расположенных по принципу РЕО-РРО-РЕО (рис. 1а) [3, 11, 24], молекулярная масса которого колеблется в интервале 7680–9510 Да. Более точные данные для плуроника F68 приведены в работе [12]: молекулярная масса 8400, состав из 28,97 РРО и 152,73 РЕО. Согласно данным этих исследователей, критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) равна $4,8 \times 10^{-4} \text{M}$ (0,4%), что хорошо совпадает с данными других авторов. Например, в исследованиях [11, 20] ККМ для F68 равнялось 4,204 мг/мл или 0,4%.

При растворении в воде плуроник может образовывать различные структуры в зависимости от его концентрации: ниже ККМ плуроник будет находиться в растворе в виде мономера, выше ККМ в виде мицелл, состоящих из гидрофобного ядра (из РРО) и гидрофильной оболочки (из РЕО) (рис. 1б). И сополимер, и мицеллы электростатически нейтральны. При высоких концентрациях (выше 20%) мицеллярный раствор плуроника образует гель [25].

Путем самосборки или в комбинации с другими материалами плуроники могут образовывать наноносители с различной морфологией, представляющие собой своего рода многофункциональные фармацевтические наполнители. Применение мицелл плуроника для доставки лекарств позволяет повысить растворимость гидрофобных лекарственных веществ, что улучшает их биодоступность [8, 13]. Благодаря хорошей биосовместимости и амфифильным свойствам плуроники являются многообещающим биологическим материалом, который широко используется для доставки лекарств в составе новой лекарственной формы, для диагностики и лечения заболеваний [11, 15, 16]. Например, нанокомплексы на основе плуроника с доксорубицином и ионами железа дают возможность улучшить доставку препарата к рако-

© 2024 г. Кувырченкова А.П., Голева Т.Н., Рогов А.Г., Трунаева М.А., Лотош Н.Ю., Селищева А.А.

* **Автор для переписки:**

Кувырченкова Анастасия Павловна
младший научный сотрудник, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
e-mail: nastya_kuvirchenkova@mail.ru.

вым клеткам и преодолеть устойчивость раковых клеток к окислительному стрессу и запуску апоптоза, путем сочетания системы запуска апоптоз/ферроптоз [7].

Плюроник F68 обладает биологической и фармакологической активностью. Так, например, он оказывает цитопротекторное воздействие на клеточные мембраны, снижая повреждения, вызванные окислительным стрессом и воспалительными процессами. Плюроник F68 предотвращает переход фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточной мембраны, активацию каспазы и снижение мембранного потенциала, что свидетельствует

о влиянии F68 на механизм апоптоза [21]. Это делает его перспективным агентом для лечения заболеваний, связанных с клеточным повреждением. Плюроник обладает иммуномодулирующими свойствами, уменьшая воспалительные реакции и способствуя регенерации тканей. Плюроник F68 способен предотвращать агрегацию клеток крови, что важно для профилактики тромбообразования и улучшения микроциркуляции. Плюроник F68 улучшал проницаемость и текучесть эритроцитов, особенно в условиях низкого уровня кислорода, что уменьшает риск агрегации и способствует микроциркуляции [22].

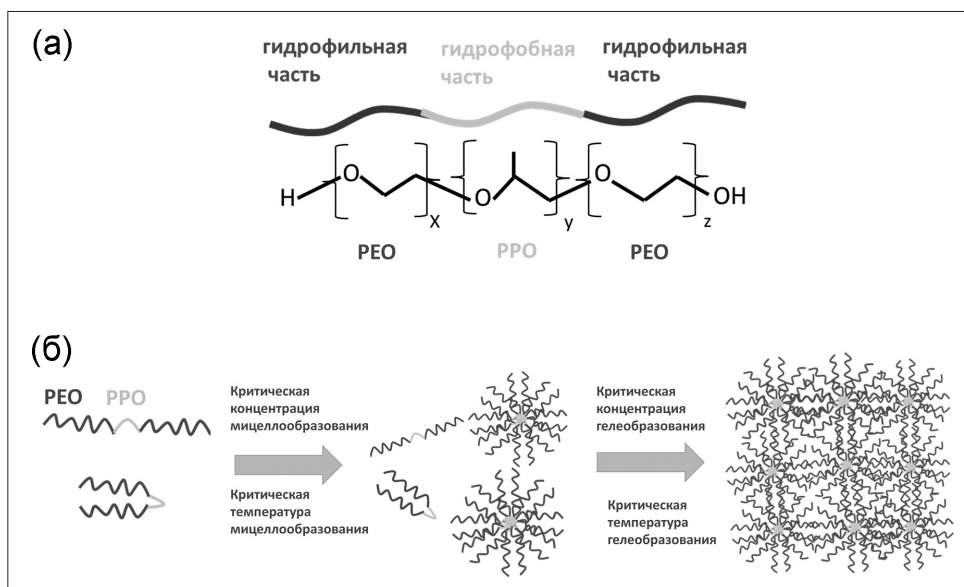


Рис.1. Строение плюроника F68: (а) мономер; (б) образование мицелл и геля [11]

На примере нескольких линий опухолевых клеток с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) было показано, что блок-сополимеры плюроника: 1) внедряются в мембрану; 2) вызывают резкое снижение уровня АТФ; 3) тормозят работу помп многолекарственной устойчивости; 4) увеличивают продукцию АФК и вызывают высвобождение цитохрома С; 5) усиливают проапоптотическое снижение передачи сигналов и антиапоптотическую защиту в MDR-клетках; 6) подавляют антиоксидантную защиту клетки и 7) устраняют секвестрацию лекарств внутри цитоплазматических везикул [3].

Сопоставление данных по действию плюроника F68 на нормальные клетки в стрессовых условиях [21] говорит о том, что он способствует улучшению функционального состояния клеток, в то время как воздействие на опухолевые клетки приводит к снижению их физиологического статуса [3].

Предположение о защитных функциях плюроника от окислительного стресса, о влиянии на запуск апоптоза и его способностях взаимодействовать с мембранами

приводит к пониманию необходимости более детального изучения взаимодействия плюроника с митохондриями как с основными органеллами — поставщиками АФК и ключевым звеном в запуске запрограммированной клеточной гибели.

Результаты исследования действия плюроников на функции выделенных митохондрий весьма скромны и, более того, противоречивы. Несмотря на множество данных о том, что плюроник F68 улучшает митохондриальную функцию на нейронах [9, 18, 23] и на различных моделях инфаркта миокарда [2, 9], в работе [17] на выделенных митохондриях (МХ) мозга крысы F68 он не показал прямого защитного действия на функцию МХ после асфиксии *in vivo* и повреждения H_2O_2 *in vitro*. На выделенных митохондриях сердца крысы после ишемии/реперфузии [9] также не наблюдали защитного действия F68 непосредственно на митохондриальную функцию.

Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение процесса мицеллообразования плюроника в

зависимости от условий и действие этого соединения на функциональные показатели МХ печени крысы.

Материалы и методы

Реактивы. Для исследований использовали смесь фосфолипидов сои S75 (Lipoid S75, Германия), которая содержала 75,3% фосфатидилхолина (ФХ), 8% фосфатидилэтаноламина (ФЭА), 1,4% лизофосфатидилхолина, 1,0% фосфатидной кислоты, 0,8% фосфатидилинозитола и 0,3% триглицеридов. Плюроник F68 или полксамер 188 (Sigma, США).

Анализ размера частиц. Размер частиц, дзета-потенциал и индекс полидисперсности (ИП) анализировали методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания) при температуре 37 °С. Каждый параметр измерялся трижды.

Выделение митохондрий печени крысы. Все эксперименты на животных были одобрены локальным этическим комитетом Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (протокол от 20 декабря 2022 г. № 1). В экспериментах использовали крыс-самцов линии Wistar в возрасте 2–3 месяцев (200–250 г). Митохондрии печени крысы выделяли методом дифференциального центрифугирования по методике, описанной в [1] с небольшими изменениями. Выделенную печень промывали в охлажденном растворе 0,25 М сахарозы, разрушали путем продавливания через пресс и суспендировали в среде, содержащей 0,09 М сахарозу, 0,21 М маннит, 5 мМ Tris-HCl – буфер (рН 7,2), 0,5 мМ ЭГТА и 0,4%-ный бычий сывороточный альбумин, свободный от жирных кислот (БСА). Неразрушенные ткани, клетки и ядра отделяли центрифугированием в течение 5 минут при 900 g. Митохондриальную фракцию суспендировали в основной среде инкубации, состоящей из 10 мМ трис-HCl-буфера (рН 7,2), содержащего 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу и 0,5 мМ ЭГТА; суспензию центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин, затем осадок митохондрий ресуспендировали в минимальном объеме той же среды. Препараты митохондрий хранили на льду не более 5 часов.

Определение общего митохондриального белка. Общий белок митохондрий измеряли по методу Бредфорда [5] относительно БСА, на спектрофотометре (PERSEE T6U, Китай).

Поглощение кислорода митохондриями измеряли амперометрически с использованием электрода типа Кларка в системе OxuGraph Plus (Hansatech Instruments Ltd, Великобритания), как описано в [6]. Базовая инку-

бационная среда, содержащая 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу и 2 мМ Tris-HCl-буфер, рН 7,2, добавляли 20 мМ Tris-сукцинат + ротенон (2 мкг/мг белка) или 20 мМ трис-глутамат + 5 мМ трис-малат, 0,5 мМ ЭГТА и митохондрии (0,5 мг белка/мл).

Мембранный потенциал, генерируемый на внутренней мембране митохондрий, регистрировали спектрофотометрически на многофункциональном ридере планшетного формата с автоматической системой дозирования Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США). В основную среду инкубации добавляли 20 мМ Tris-сукцинат + ротенон (2 мкг/мг белка), 0,5 мМ ЭГТА, 20 мкМ сафранин О в качестве потенциалзависимого зонда и митохондрии (0,5 мг белка/мл).

Набухание митохондрий оценивали спектрофотометрически по снижению оптической плотности суспензии митохондрий при 540 нм [10] на многофункциональном ридере планшетного формата с автоматической системой дозирования Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США). Основная инкубационная среда была дополнена 20 мМ Tris-сукцинатом + ротеноном (2 мкг/мг белка), 40 мМ KCl, митохондриями (0,5 мг белка/мл) и, где указано, 0,5 мМ ЭГТА.

Открытие неспецифической Ca^{2+}/Pi -зависимой митохондриальной поры (mPTP) детектировали на основе двух параметров: снижение мембранного потенциала и набухания митохондрий, для данного измерения митохондрии выделяли и инкубировали в среде без ЭГТА, как рекомендовано в [4].

Скорость синтеза АТФ оценивали спектрофотометрическим методом, основанном на изменении рН во время превращения АДФ в АТФ, с использованием Фенолового красного в качестве индикатора рН; измерение проводилось на многофункциональном ридере планшетного формата с автоматической системой дозирования Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) при длинах волн 557/618 нм. Основная среда инкубации была дополнена 0,5 мМ ЭГТА, 25 мкМ Феноловым красным и митохондриями (0,5 мг митохондриальных белка/мл). Синтез АТФ индуцировали добавлением 500 мкМ АДФ. Во всех исходных растворах и добавках рН тщательно доводили до 7,1.

Скорость образования пероксида водорода определяли флуорометрически, измерение проводилось на многофункциональном ридере планшетного формата с автоматической системой дозирования Varioscan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) на основе системы анализа Amplex Red/пероксидазы хрена (HRP). Супероксид-анион-радикал, первоначально образованный

митохондриями, спонтанно или под действием супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода, которая окисляет бесцветное вещество Amplex Red с образованием высоко флуоресцентного продукта резорурфина (длины волн возбуждения и флуоресценции 563 и 587 нм соответственно). Основная среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-сукцинатом, 5 мкМ AmplexRed, 9 МЕ/мл пероксидазой хрена, 6 мМ аминотриазолом (ингибитор каталазы) и митохондриями (0,5 мг белка/мл).

Результаты

Образование мицелл плюроником F68 в средах различного состава

Изучение размеров агрегатов, образованных плюроником F68 в воде и в среде для инкубации МХ в диапазоне концентрации от 0,01 до 0,7% проводили методом динамического светорассеяния. На рисунке 2 приведены результаты определения размеров частиц плюроника в воде при двух температурах среды (20 и 37 °С) и в среде инкубации МХ, содержащей 0,21 М маннит, 0,09 М сахарозу, 2 мМ Трис-НСl-буфер, 0,5 мМ ЭГТА, рН 7,2; митохондрии добавляли из расчета 0,5 мг белка/мл.

Из рисунка 2 следует, что в воде при достижении концентрации 0,1–0,2% плюроник F68 существует в

двух фазовых состояниях: 50% в виде мономера и 50% в виде мицелл. Иными словами, именно в этом интервале концентраций находится ККМ. Повышение температуры до 37 °С никак не влияет на этот показатель и не вызывает образования геля.

В среде Хенкса и в среде инкубации МХ также наблюдается образование мицелл в диапазоне концентраций 0,1–0,2%, однако процент образования мицелл размером 5–10 нм весьма мал и не превышает 20% даже при концентрации плюроника 0,7%, при которой в водной фазе уже весь плюроник находился в виде мицелл.

Поведение мицелл плюроника F68 в присутствии МХ печени крысы

Чтобы понять, имеет ли место взаимодействие между мицеллами плюроника и МХ, определяли размер мицелл плюроника в том же диапазоне концентраций, а затем инкубировали их с МХ в течение 30 мин.

Далее образцы центрифугировали и вновь определяли наличие мицелл в супернатанте. Как было описано выше, критическая концентрация мицеллообразования для плюроника F68 составила 0,1–0,2% в воде, в среде Хенкса и в среде для инкубации МХ. После инкубации с МХ (см. рис. 2) мицеллы в супернатанте отсутствовали. Таким образом, в присутствии МХ они либо разрушались, либо поглощались этими органеллами.

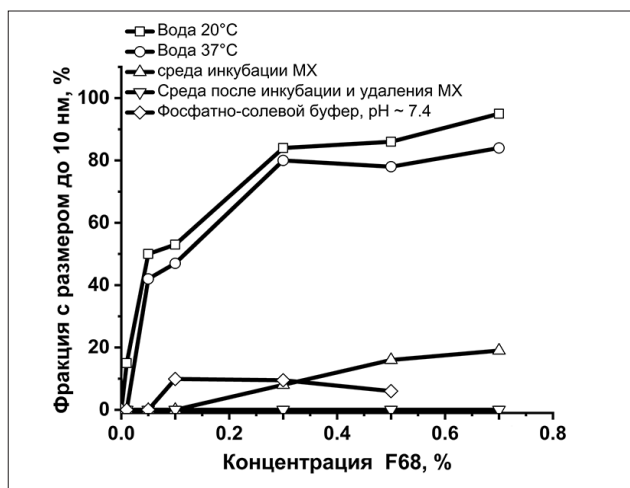


Рис. 2. Процент образования частиц плюроника размером 5–10 нм в воде при 20 и 37 °С и в среде инкубации МХ

Действие плюроника F68 на выделенные МХ печени крысы

Оценку влияния различных концентраций плюроника F68 на функциональные показатели МХ проводили на изолированных митохондриях печени крысы, выделенных по вышеописанной методике [1]. Препараты митондрий соответствовали всем известным

критериям физиологической интактности и сохраняли свои функциональные свойства в течение 5 часов при хранении на льду.

Исследовали действие плюроника F68 в диапазоне концентраций 0,01%–1,25% на скорость поглощения кислорода выделенными митохондриями (рис. 3а). 0,25%-ный плюроник F68 незначительно увеличивал

скорость окисления NAD-зависимых субстратов (глутамата + малата) и сукцината (в присутствии ротенона, ингибитора комплекса I) в состоянии 4 дыхания. Плю-

роник F68 не влиял на скорость дыхания при окислении глутамата + малата в состоянии 3 дыхания, то есть в присутствии АДФ (рис. 3б).

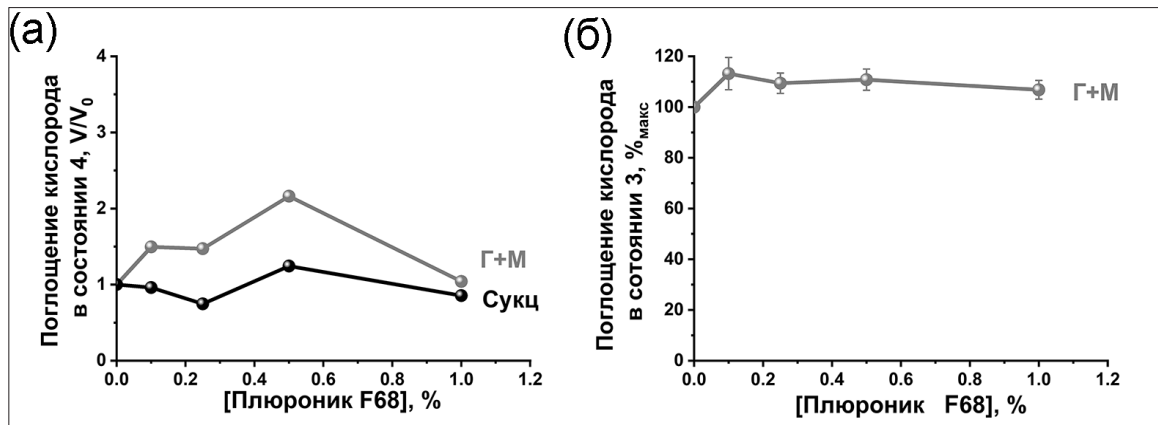


Рис. 3. Действие плюроника F68 на скорость поглощения кислорода митохондриями в состоянии 4 (а) и в состоянии 3 (б). Основная среда инкубации содержала (здесь и далее) 0,21 М маннитол, 0,09 М сахарозу, 2 мМ трис-фосфат, рН 7,2, 0,5 мМ ЭГТА, дополнена 20 мМ трис-сукцинатом + ротеноном (2 мкг/мг белка) (Сукц) или 20 мМ трис-глутаматом + 5 мМ трис-малатом (Г+М) и митохондриями (0,5 мг белка/мл). В (б) среда была дополнена 900 нМ АДФ

Таким образом, плюроник F68 не оказывал специфического действия на комплексы I и II дыхательной цепи митохондрий.

При измерении скорости синтеза АТФ митохондриями было показано, что плюроник F68 не ингибировал синтез АТФ и не являлся специфическим

ингибитором АТФ-синтазы (рис. 4а). На выделенных митохондриях печени крысы плюроник F68 не увеличивал продукцию перекиси водорода, но и не проявлял защитного действия, то есть плюроник F68 сам по себе в концентрациях 0,01%–1% не являлся ни про-, ни антиоксидантом (рис. 4б).

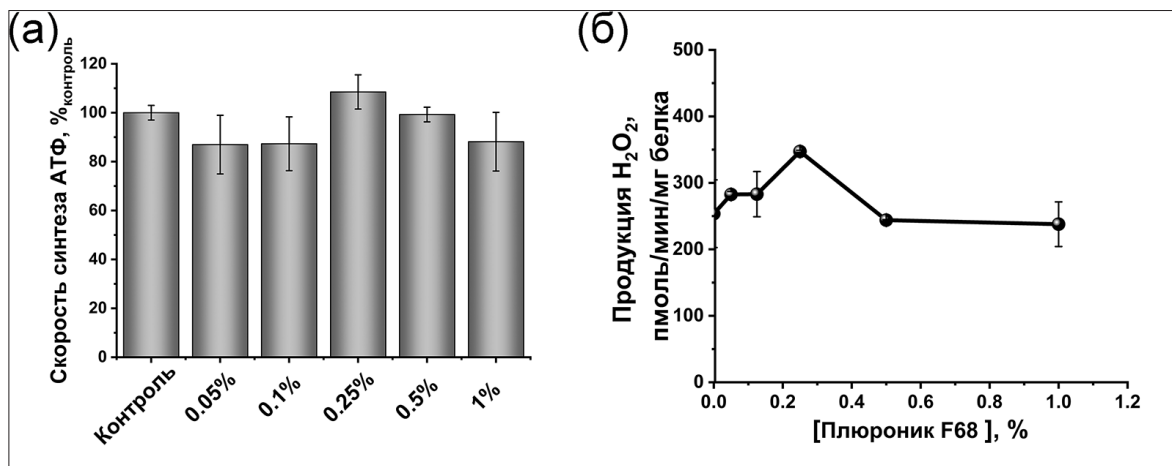


Рис. 4. Влияние плюроника F68 на продукцию АТФ (а) и генерацию пероксида водорода (б) митохондриями печени крысы. Основная среда инкубации дополнена: а) 0,5 мМ ЭГТА, 20 мМ Трис-сукцинатом + ротеноном (2 мкг/мг белка), митохондриями (0,5 мг белка/мл), 20 мкМ Феноловым красным; б) 20 мМ трис-сукцинатом, 0,5 мМ ЭГТА, 5 мкМ Amplex Red, 9 м.е./мл пероксидазой хрена, 6 мМ аминотриазолом и митохондриями (0,5 мг белка/мл).

В среде, не содержащей ионов кальция, в присутствии ЭГТА не происходило спонтанного снижения мембранного потенциала. Все исследованные концентрации плюроника F68 также не снижали мембранный по-

тенциал (рис. 5а) и не вызывали набухания митохондрий (рис. 5б), при этом добавление 5 мкМ Аламетицина, известного пороформера [14], вызывало высокоамплитудное набухание митохондрий.

В присутствии Ca^{2+} в среде, не содержащей ЭГТА, также не происходило спонтанного снижения мембранного потенциала (рис. 6а), но наблюдалось слабое набухание митохондрий (рис. 6б).

Поскольку при добавлении ЭГТА набухание прекращалось и наблюдалось некоторое повышение

мембранного потенциала, данные эффекты могут быть связаны с частичным открытием mPTP [19]. Мембранный потенциал снижался при добавлении 0,25%-ного плюроника F68 и восстанавливался в присутствии ЭГТА (рис. 6а), что свидетельствует о промотировании им открытия mPTP.

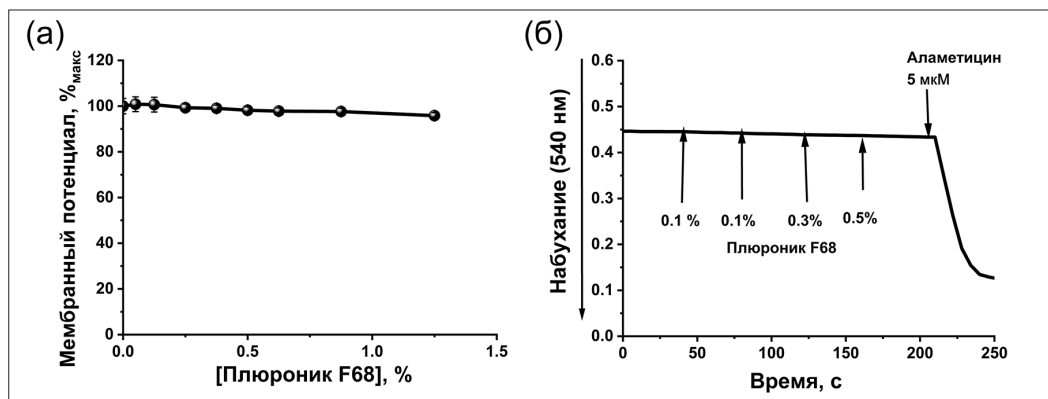


Рис. 5. Влияние плюроника F68 на мембранный потенциал (а) и набухание (б) выделенных митохондрий печени крысы. Основная среда инкубации дополнена 20 мМ трис-сукцинатом + ротеином (2 мкг/мг белка), 0,5 мМ ЭГТА, митохондриями (0,5 мг белка/мл) и либо 20 мкМ Сафранином О (а), либо 40 мМ КСl (б)

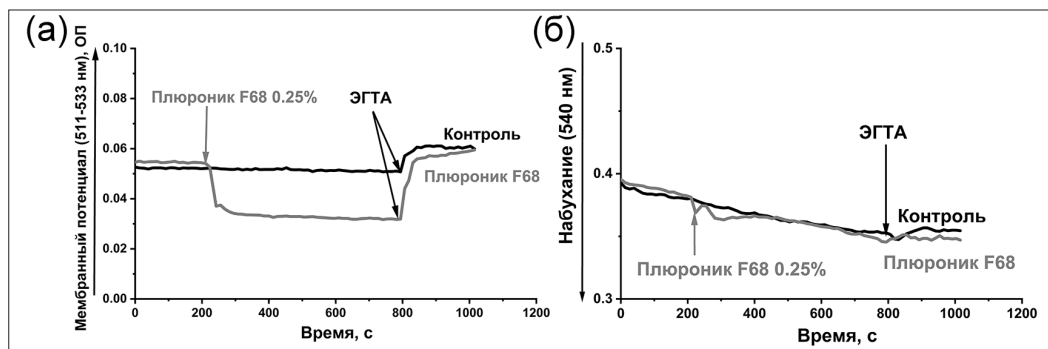


Рис. 6. Действие плюроника F68 на мембранный потенциал (а) и набухание (б) изолированных митохондрий печени крысы в среде, не содержащей ЭГТА. Среда инкубации была дополнена 20 мМ трис-сукцинатом + ротеином (2 мкг/мг), митохондриями (0,5 мг белка/мл), 30 мкМ Ca^{2+} и либо 20 мкМ сафранином О (а), либо 40 мМ КСl (б). Где указано, добавляли 0,5 мМ ЭГТА

Обсуждение и заключение

Способность плюроников образовывать частицы (мицеллы) можно охарактеризовать по величине ККМ, для определения которой используют несколько разных методов: определение оптической активности раствора красителя; определение натяжения при введении плюроника; определение размера частиц. Для плюроника F68 этот показатель колеблется в интервале 0,1–0,2% по весу или $2-4 \times 10^{-4}$ М [12], измеренный по флуоресценции пирена, спектрофотометрическим методом по поглощению Судана 111 и тензиометрически [20], что хорошо совпадает с ККМ F68, полученной методом флуоресценции.

Полученные в настоящей работе значения, которые вполне укладываются в этот интервал, весьма важны в связи с ранее полученными данными о различной физиологической активности мономеров и мицелл для выживаемости клеток нейробластомы [20], где было установлено, что F68 в виде мономера увеличивал выживаемость клеток нейробластомы дозозависимым образом, в то время как в виде мицелл, наоборот, снижал их выживаемость в зависимости от концентрации.

При изучении мицеллообразования плюроника F68 в среде Хенкса и в среде инкубации МХ было показано, что образование мицелл начинается в том же интервале концентраций, что и в воде, однако процент

образования мицелл был значительно меньше и не превышал 20%. Это означает, что большая часть плуроника F68 в такой среде находится в виде мономера, который, как было установлено на примере нейробластомы, способствовал повышению функциональной активности клеток.

Данные об исчезновении мицелл плуроника размером 5–10 нм после инкубации с МХ не дают информации о механизмах их исчезновения. Процесс предположительно мог происходить разными путями: 1) мицеллы поглощались МХ; 2) наоборот, МХ поглощали мономер плуроника, поэтому его концентрация во внешней среде уменьшалась, что приводило к разрушению мицелл; 3) мицеллы плуроника не поглощались МХ, а просто адсорбировались на внешней мембране.

При изучении физиологической активности МХ в присутствии плуроника нами было найдено, что плуроник F68 не является ингибитором комплексов I или II дыхательной цепи митохондрий, не обладал разобщающим действием и не увеличивал продукцию перекиси водорода митохондриями, не являлся специфическим ингибитором АТФ-синтазы. Для потенциальных носителей терапевтических препаратов отсутствие собственного физиологического действия на объект служит положительной характеристикой.

При этом плуроник F68, по-видимому, содействовал открытию mPTP в митохондриях при наличии ионов Ca^{2+} в среде. В литературе упоминается способность плуроников взаимодействовать непосредственно с мембранами [3], и показанное нами снижение количества мицелл плуроника F68 при инкубации с митохондриями позволяет предположить, что, возможно, открытие поры связано с непосредственным встраиванием плуроника в мембрану митохондрий и изменением ее конформации без потери ею барьерной для протонов функции.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» и темы государственной регистрации №121031600197-5 МГУ им. М.В. Ломоносова. Животные были предоставлены виварием экспериментально-биологической клиники НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Рогов А.Г., Голева Т.Н., Тренделева Т.А., Овченкова А.П., Аливердиева Д.А., Звягильская Р.А. Новые данные о действии SkQ1 и SkQT1 на митохондрии печени

крысы и клетки дрожжей // Биохимия. — 2018. — Т. 83. — № 5. — С. 724–734.

2. Bartos J.A., Matsuura T.R., Tsangaris A., Olson M., McKnite S.H., Rees J.N., Haman K., Shekar K.C., Riess M.L., Bates F.S., Metzger J.M., Yannopoulos D. Intracoronary Poloxamer 188 prevents reperfusion injury in a porcine model of ST-segment elevation myocardial infarction // JACC Basic Transl. Sci. — 2016. — Vol. 1. — No. 4. — P. 224–234.
3. Batrakova E.V., Kabanov A.V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers // Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society. — 2008. — Vol. 130. — No. 2. — P. 98–106.
4. Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target // The FEBS Journal. — 2006. — Vol. 273. — No. 10. — P. 2077–2099.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
6. Chance B., Williams G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation // Nature. — 1955. — Vol. 175. — No. 4469. — P. 1120–1121.
7. Chen H., Yan Z., Wu S., Li F. A glutathione-responsive polyphenol – Constructed nanodevice for double roles in apoptosis and ferroptosis // Colloids and surfaces B, Biointerfaces. — 2021. — Vol. 205. — Art. 111902. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111902.
8. Chen T., Li Y., Li C., Yi X., Wang R., Lee S.M., Zheng Y. Pluronic P85/F68 micelles of baicalein could interfere with mitochondria to overcome MRP2-mediated efflux and offer improved anti-parkinsonian activity // Molecular Pharmaceutics. — 2017. — Vol. 14. — No. 10. — P. 3331–3342.
9. Eskaf J., Cleveland W.J., Riess M.L. No direct postconditioning effect of Poloxamer 188 on mitochondrial function after ischemia reperfusion injury in rat isolated hearts // International Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol. 22. — No. 9. — Art. 4879. doi: 10.3390/ijms22094879.
10. Goleva T.N., Rogov A.G., Korshunova G.A., Trendelleva T.A., Mamaev D.V., Aliverdieva D.A., Zvyagilskaya R.A. SkQThy, a novel and promising mitochondria-targeted antioxidant // Mitochondrion. — 2019. — Vol. 49. — P. 206–216.
11. Khaliq N.U., Lee J., Kim S., Sung D., Kim H. Pluronic F-68 and F-127 based nanomedicines for advancing combination cancer therapy // Pharmaceutics. — 2023. — Vol. 15. — No. 8. — Art. 2102. doi: 10.3390/pharmaceutics15082102.
12. Kozlov M.Y., Melik-Nubarov N.S., Batrakova E.V., Kabanov A.V. Relationship between pluronic block copolymer structure, critical micellization concentration and partitioning coefficients of low molecular mass solutes // Macromolecules. — 2000. — Vol. 33. — No. 9. — P. 3305–3313.

13. Liu Y., Tan Y., Cheng G., Ni Y., Xie A., Zhu X., Yin C., Zhang Y., Chen T. Customized intranasal hydrogel delivering methylene blue ameliorates cognitive dysfunction against Alzheimer's disease // *Advanced Materials* (Deerfield Beach, Fla). — 2024. — Vol. 36. — No. 19. — e2307081. doi: 10.1002/adma.202307081.
14. Mathew M.K., Balaran P. Alamethicin and related membrane channel forming polypeptides // *Molecular and Cellular Biochemistry*. — 1983. — Vol. 50. — No. 1. — P. 47–64.
15. Oh K.S., Song J.Y., Cho S.H., Lee B.S., Kim S.Y., Kim K., Jeon H., Kwon I.C., Yuk S.H. Paclitaxel-loaded Pluronic nanoparticles formed by a temperature-induced phase transition for cancer therapy // *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. — 2010. — Vol. 148. — No. 3. — P. 344–350.
16. Patel P., Raval M., Manvar A., Airao V., Bhatt V., Shah P. Lung cancer targeting efficiency of Silibinin loaded poly caprolactone /Pluronic F68 inhalable nanoparticles: In vitro and in vivo study // *PloS One*. — 2022. — Vol. 17. — No. 5. — e0267257. doi: 10.1371/journal.pone.0267257.
17. Pille J.A., Riess M.L. Potential effects of Poloxamer 188 on rat isolated brain mitochondria after oxidative stress in vivo and in vitro // *Brain Sciences*. — 2021. — Vol. 11. — No. 1. — Art. 122. doi: 10.3390/brainsci11010122.
18. Piper H.M., García-Dorado D., Ovize M. A fresh look at reperfusion injury // *Cardiovascular Research*. — 1998. — Vol. 38. — No. 2. — P. 291–300.
19. Rogov A.G., Goleva T.N., Aliverdieva D.A., Zvyagil'skaya R.A. SkQ3 exhibits the most pronounced antioxidant effect on isolated rat liver mitochondria and yeast cells // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2024. — Vol. 25. — No. 2. — Art. 1107. doi: 10.3390/ijms25021107.
20. Samith V., Ramos-Moore E., Arancibia-Miranda N., Miño G. Effects of Pluronic F68 micellization on the viability of neuronal cells in culture // *Journal of Applied Polymer Science*. — 2013. — Vol. 130. — Issue 3. — P. 2159–2164.
21. Shelat P.B., Plant L.D., Wang J.C., Lee E., Marks J.D. The membrane-active tri-block copolymer Pluronic F-68 profoundly rescues rat hippocampal neurons from oxygen–glucose deprivation-induced death through early inhibition of apoptosis // *The Journal of Neuroscience*. — 2013. — Vol. 33. — No. 30. — P. 12287–12299.
22. Smith C.M. 2nd, Hebbel R.P., Tukey D.P., Clawson C.C., White J.G., Vercellotti G.M. Pluronic F-68 reduces the endothelial adherence and improves the rheology of liganded sickle erythrocytes // *Blood*. — 1987. — Vol. 69. — No. 6. — P. 1631–1636.
23. Wang J.C., Bindokas V.P., Skinner M., Emrick T., Marks J.D. Mitochondrial mechanisms of neuronal rescue by F-68, a hydrophilic Pluronic block co-polymer, following acute substrate deprivation // *Neurochem. Int*. — 2017. — Vol. 109. — P. 126–140.
24. Yu J., Qiu H., Yin S., Wang H., Li Y. Polymeric drug delivery system based on Pluronics for cancer treatment // *Molecules* (Basel, Switzerland). — 2021. — Vol. 26. — No. 12. — Art. 3610. doi: 10.3390/molecules26123610.
25. Zhao X.Y., Cao Y.R., Xiao R.J., Cao G.R. Rheological properties and microstructures of thermo-sensitive microemulsion-based gels // *Advanced Materials Research*. — 2012. — Vol. 557–559. — P. 1009–1012. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.557-559.1009.

References

1. Rogov AG, Goleva TN, Trendeleva TA, Ovchenkova AP, Aliverdiyeva DA, Zvyagil'skaya RA. Novyye dannyye o deystvii SkQ1 i SkQT1 na mitokhondrii pečeni krysy i kletki drozhzhey. *Biokhimiya* 2018; 83(5):724–734 (in Russian).
2. Bartos JA, Matsuura TR, Tsangaris A, Olson M, McKnite SH, Rees JN, Haman K, Shekar KC, Riess ML, Bates FS, Metzger JM, Yannopoulos D. Intracoronary Poloxamer 188 prevents reperfusion injury in a porcine model of ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Basic Transl Sci* 2016; 1(4):224–234.
3. Batrakova EV, Kabanov AV. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2008; 130(2):98–106.
4. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, Forte MA. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *The FEBS Journal* 2006; 273(10):2077–2099.
5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72:248–254.
6. Chance B, Williams GR. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature* 1955; 175(4469):1120–1121.
7. Chen H, Yan Z, Wu S, Li F. A glutathione-responsive polypheno:nstructured nanodevice for double roles in apoptosis and ferroptosis. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2021; 205:111902. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111902.
8. Chen T, Li Y, Li C, Yi X, Wang R, Lee SM, Zheng Y. Pluronic P85/F68 micelles of baicalein could interfere with mitochondria to overcome MRP2-mediated efflux and offer improved anti-parkinsonian activity. *Molecular Pharmaceutics* 2017; 14(10):3331–3342.
9. Eskaf J, Cleveland WJ, Riess ML. No direct postconditioning effect of Poloxamer 188 on mitochondrial function after ischemia reperfusion injury in rat isolated hearts. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(9):4879. doi: 10.3390/ijms22094879.
10. Goleva TN, Rogov AG, Korshunova GA, Trendeleva TA, Mamaev DV, Aliverdieva DA, Zvyagil'skaya RA. SkQThy, a novel and promising mitochondria-targeted antioxidant. *Mitochondrion* 2019; 49:206–216.

11. Khaliq NU, Lee J, Kim S, Sung D, Kim H. Pluronic F-68 and F-127 based nanomedicines for advancing combination cancer therapy. *Pharmaceutics* 2023; 15(8):2102. doi: 10.3390/pharmaceutics15082102.
12. Kozlov MY, Melik-Nubarov NS, Batrakova EV, Kabanov AV. Relationship between pluronic block copolymer structure, critical micellization concentration and partitioning coefficients of low molecular mass solutes. *Macromolecules* 2000; 33(9):3305–3313.
13. Liu Y, Tan Y, Cheng G, Ni Y, Xie A, Zhu X, Yin C, Zhang Y, Chen T. Customized intranasal hydrogel delivering methylene blue ameliorates cognitive dysfunction against Alzheimer's disease. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla)* 2024; 36(19):e2307081. doi: 10.1002/adma.202307081.
14. Mathew MK, Balaran P. Alamethicin and related membrane channel forming polypeptides. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1983; 50(1):47–64.
15. Oh KS, Song JY, Cho SH, Lee BS, Kim SY, Kim K, Jeon H, Kwon IC, Yuk SH. Paclitaxel-loaded Pluronic nanoparticles formed by a temperature-induced phase transition for cancer therapy. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 2010; 148(3):344–350.
16. Patel P, Raval M, Manvar A, Airao V, Bhatt V, Shah P. Lung cancer targeting efficiency of Silibinin loaded poly caprolactone /Pluronic F68 inhalable nanoparticles: In vitro and in vivo study. *PloS One* 2022; 17(5):e0267257. doi: 10.1371/journal.pone.0267257.
17. Pille JA, Riess ML. Potential effects of Poloxamer 188 on rat isolated brain mitochondria after oxidative stress in vivo and in vitro. *Brain Sciences* 2021; 11(1):122. doi: 10.3390/brainsci11010122.
18. Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 1998; 38(2):291–300.
19. Rogov AG, Goleva TN, Aliverdieva DA, Zvyagil'skaya RA. SkQ3 exhibits the most pronounced antioxidant effect on isolated rat liver mitochondria and yeast cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2024; 25(2):1107. doi: 10.3390/ijms25021107.
20. Samith V, Ramos-Moore E, Arancibia-Miranda N, Miño G. Effects of Pluronic F68 micellization on the viability of neuronal cells in culture. *Journal of Applied Polymer Science* 2013; 130(3):2159–2164.
21. Shelat PB, Plant LD, Wang JC, Lee E, Marks JD. The membrane-active tri-block copolymer Pluronic F-68 profoundly rescues rat hippocampal neurons from oxygen–glucose deprivation-induced death through early inhibition of apoptosis. *The Journal of Neuroscience* 2013; 33(30):12287–12299.
22. Smith CM 2nd, Hebbel RP, Tukey DP, Clawson CC, White JG, Vercellotti GM. Pluronic F-68 reduces the endothelial adherence and improves the rheology of liganded sickle erythrocytes. *Blood* 1987; 69(6):1631–1636.
23. Wang JC, Bindokas VP, Skinner M, Emrick T, Marks JD. Mitochondrial mechanisms of neuronal rescue by F-68, a hydrophilic Pluronic block co-polymer, following acute substrate deprivation. *Neurochem. Int* 2017; 109:126–140.
24. Yu J, Qiu H, Yin S, Wang H, Li Y. Polymeric drug delivery system based on Pluronics for cancer treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2021; 26(12):3610. doi: 10.3390/molecules26123610.
25. Zhao XY, Cao YR, Xiao RJ, Cao GR. Rheological properties and microstructures of thermo-sensitive micro-emulsion-based gels. *Advanced Materials Research* 2012; 557–559:1009–1012. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.557-559.1009.

EFFECT OF THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF PLURONIC F68 ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF RAT LIVER MITOCHONDRIA

A.P. KUVYRCHENKOVA¹, T.N. GOLEVA¹, A.G. ROGOV¹, M.A. TRUNAEVA²,
N.Yu. LOTOSH¹, A.A. SELISHCHEVA¹

¹ *National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow;*

² *MIREA-Russian Technological University,*

³ *Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The process of micelle formation of Pluronic F68 in water, in phosphate-buffered saline and in the medium for mitochondrial incubation was studied using the dynamic light scattering method. For all studied media, the critical micelle concentration is in the range of 0,1–0,3% by weight (or $2–4 \times 10^{-4}$ M), which is consistent with previously obtained data. However, the percentage of formation of micelles of 6–10 nm in size in a medium with pH 7,2 (phosphate buffered saline and mitochondrial incubation medium) is significantly lower than in water. Incubation of Pluronic F68 with mitochondria led to the disappearance of micelles, which may be a consequence of both their penetration into the mitochondria and the result of adsorption on the mitochondrial surface. The effect of different concentrations of Pluronic F68 on the functional parameters of mitochondria and the rate of oxygen consumption during the oxidation of various substrates was studied. It was shown that Pluronic F68 did not affect the rate of respiration in states 3 and 4, did not

reduce the membrane potential, did not cause swelling of mitochondria, did not change the rate of hydrogen peroxide generation and did not affect the work of ATP synthase. At a concentration of 0,25%, Pluronic F68 reversibly opened a nonspecific mitochondrial pore.

Keywords: liver, mitochondria, pluronic F68, dynamic light scattering, rats.

Address:

Kuvyrchenkova A.P.

Junior Researcher, National Research Centre

«Kurchatov Institute»

E-mail: nastya_kuvirchenkova@mail.ru.

Для цитирования:

Кувырченкова А.П., Голева Т.Н., Рогов А.Г., Трунаева М.А., Лотош Н.Ю., Селищева А.А. Влияние структурной организации плуроника F68 на функциональную активность митохондрий печени крысы. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):50–59.

For citation:

Kuvyrchenkova A.P., Goleva T.N., Rogov A.G., Trunaeva M.A., Lotosh N.Yu., Selishcheva A.A. Effect of the structural organization of Pluronic F68 on the functional activity of rat liver mitochondria. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4):50–59 (in Russian).

ПОДБОР РЕАГЕНТОВ СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ВИРУСА ГЕПАТИТА В МЕТОДОМ ПЦР

С.Г. МАРДАНЛЫ^{1,2}, И.И. ЕРМОЛАЕВ^{1*}, И.И. ИЛЬИН^{1,2}

¹АО «ЭКОлаб», Электрогорск;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), Орехово-Зуево

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — хорошо зарекомендовавший себя метод для диагностики различных инфекционных заболеваний. Для входящих в состав ПЦР-системы реагентов неправильная транспортировка или несоблюдение температурного режима ведут к ухудшению её качества. Метод сублимационной сушки призван решить эту задачу, позволяя получить продукты с улучшенной стабильностью. В исследование включено 100 образцов сыворотки крови с 50 образцами положительными по вирусу гепатита В (HBV) и 50 отрицательными по данной инфекции, проверенных методом ПЦР с помощью набора «ГепатЭК В» (АО «ЭКОлаб» РЗН 2023/21015, Российская Федерация). Высушивание образцов проведено с помощью лабораторной сублимационной сушилки Lyovaror L-300 (ВУСНІ, Швейцария). Представлены результаты по подборке необходимых компонентов для сублимационной сушки набора реагентов «ГепатЭК В». Исследование позволило установить удовлетворяющие исследованию смеси реагентов среди множества тестируемых вариантов в концентрациях веществ: 100 мМ Трегалоза + 10% ПЭГ, 150 мМ Трегалоза + 15% ПЭГ, 200 мМ Трегалоза + 15% ПЭГ, 250 мМ Трегалоза + 10% ПЭГ. Полученные данные указывают на перспективность исследований в области сублимационной сушки для ПЦР-систем. Анализ литературы по подбору реагентов для лиофилизации ПЦР-смеси позволил добиться необходимых результатов. Возможность хранения смеси ПЦР реагентов в лиофилизированном состоянии имеет важное значение для отечественных компаний, стремящихся к обеспечению стабильности своих продуктов для клинической лабораторной диагностики и сохранению их качества.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, вирус гепатита В, лиофилизация, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Введение

Гепатит В вызывается вирусом гепатита В (HBV) — оболочечным ДНК-геномным вирусом, поражающим печень, вызывающим некроз и воспаление гепатоцеллюлярной ткани [6, 18]. Вирусные гепатиты являются одной из главных проблем общественного здравоохранения этого десятилетия. По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2022 году зарегистрировано 2,2 миллиона новых случаев вирусного гепатита, в том числе 1,2 миллиона новых случаев заражения приходилось на HBV и почти 1,0 млн новых случаев заражения HCV [17]. Согласно данным Роспотребнадзора, в Российской Федерации достигнуты значительные успехи в борьбе с острым гепатитом В (ОГВ). С 2014 по 2023 гг. заболеваемость ОГВ снизилась в 4 раза с 1,32 сл. до 0,33 сл. на 100 тыс. населения (среднегодовой

показатель заболеваемости (СМП) — 1,02 на 100 тыс. населения) и ниже среднегодового показателя в 3,1 раза [2]. Заболеваемость хроническим гепатитом В (ХГВ) выросла на 2,08% в сравнении с 2023 г. — с 6,37 до 8,45% (рис. 1).

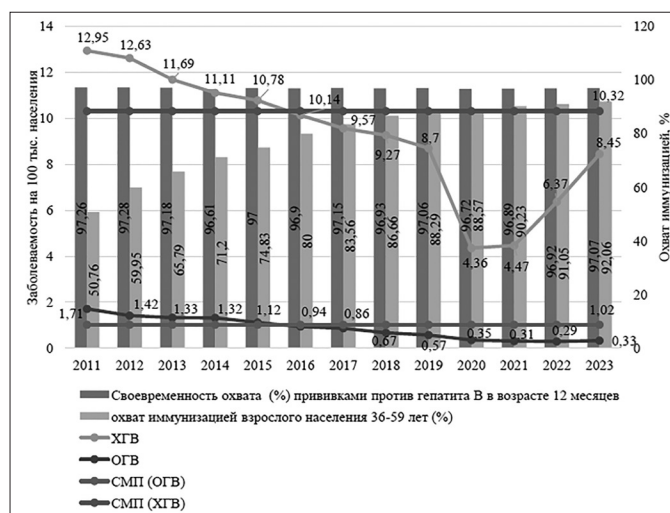


Рис. 1. Динамика заболеваемости ОГВ и ХГВ на 100 тыс. населения и охват вакцинацией против гепатита В в населении Российской Федерации, 2011–2023 гг.

© 2024 г. Марданлы С.Г., Ермолаев И.И., Ильин И.И.

* Автор для переписки:

Ермолаев Илья Игоревич

лаборант научно-производственного отдела ПЦР АО «ЭКОлаб»

E-mail: blacshadow99@gmail.com

Несмотря на принимаемые меры профилактики по предотвращению распространения инфекционных агентов, вирусные гепатиты относятся к одним из распространённых инфекционных заболеваний, смертность от которых растёт.

С целью предупреждения распространения HBV разработан и применяется ряд методов для диагностики данной инфекции, таких как: иммунохимические методы (иммуноферментный анализ — ИФА, иммунохемилюминесцентный анализ — ИХЛА и др.), молекулярно-биологические методы (полимеразная цепная реакция: ПЦР, ПЦР в реальном времени и др.) [7].

Идентификация и количественная оценка HBV методом ПЦР прочно вошла в практику клинической лабораторной диагностики и получила широкое распространение. Её по праву можно назвать «золотым стандартом», позволяющим определять HBV на самых ранних сроках, проводить количественную оценку вирусной нагрузки, с последующим выбором лекарственной терапии.

В ПЦР используются ферменты, буферы, термочувствительные реагенты, требующие особых условий хранения [12, 15]. Большинство ПЦР тест-систем подвержено нестабильности из-за повышенной температуры, что приводит к снижению эффективности и качества медицинского изделия при транспортировке и длительном хранении. Это делает необходимым использование надёжного и масштабируемого подхода для сохранения целостности и эффективности медицинских изделий. Одним из подходов для решения данной проблемы может быть применение процедуры лиофилизации, направленной на сохранение и продление срока службы компонентов ПЦР тест-системы.

Сублимационная сушка — технология сушки, широко используемая в фармацевтической промышленности [10, 11]. Лиофилизация обеспечивает сохранность продуктов, позволяя получать сухие или твёрдотельные презентации с улучшенным долговременным сроком хранения. Устойчивость при хранении помогает избежать дорогостоящих и трудоёмких поставок с соблюдением холодовой цепи.

Ряд компонентой ПЦР тест-системы остается нестабильным при проведении лиофилизации. Поддержание стабильности и последующей биологической активности ферментов до и после сублимационной сушки, последующего использования и хранения должно обладать такими же характеристиками, как и компоненты в жидком виде. Обеспечение необходимого баланса при разработке рецептур и последующем производстве проводится путём добавления в составы определённых

групп веществ, применяемых в технологических регламентах [1]. Составляющая лиофилизированной системы включает в себя базисные компоненты и вспомогательные вещества, используемые в процессе. Помимо защитных и объёмнообразующих агентов, вспомогательные вещества необходимы для контроля с помощью буферов таких физико-химических свойств, как рН, ионная сила и др.

В качестве вспомогательных веществ чаще всего используют сахараиды, полисахариды, белки и спирты, полиэтиленгликоли, обладающие различными свойствами и оказывающие своё воздействие на процесс сублимационной сушки.

Трегалоза — наиболее распространённый эксципиент при сублимационной сушке биологических агентов. Обладая молярной $M=378,33$ г/моль (дигидрат), она представляет собой нередуцирующий дисахарид, образованный двумя глюкозами, соединёнными между собой α -(1,1)-гликозидной связью. Трегалоза чаще встречается в виде дигидрата, чем ангидрата. Трегалоза образует высоковязкую матрицу при сублимационной сушке и обеспечивает водородные связи с веществами, подвергаемыми сублимационной сушке.

Маннитол является альдитом, широко используемым в сублимационных составах. Он кристаллизуется в процессе сублимационной сушки, обеспечивая механическую прочность и улучшая плотность сублимационной системы.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) — белок, нашедший широкое применение в качестве вспомогательных веществ при сублимационной сушке. При сублимационной сушке альбумин повышает T_g сухих образцов, делая возможным хранение высушенных компонентов ПЦР тест-системы при комнатной температуре.

Глицерин — полиол, широко используемый как криопротектор, предотвращающий образование вредных кристаллов льда.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молярной массой от 2000 до 20000 г/моль — высокомолекулярное соединение, обладающее стабилизирующей способностью, за счёт образования водородных связей. Он обеспечивает защиту продукта от переохлаждения и способен обеспечивать вытеснение воды с поверхности в водных растворах, способствуя получению лиофилизированного продукта [1, 16].

Нами представлены подобранные системы реагентов для лиофилизации, которые помогут преодолеть ограничения по транспортировке и стабильности продукта, для использования его в ПЦР, сохраняя при этом протокол исследования.

Цель исследования — разработка и оценка подбортанных компонентов сублимационной сушилки для качественного выявления ДНК вируса гепатита В методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы

При проведении исследования использовано 100 образцов, из них 50 с положительным и 50 образцов с отрицательным статусом на вирус гепатита В. Полученные пробы представляют собой сыворотку, охарактеризованную по набору: «ГепаЭК В», АО «ЭКОлаб» (РЭН 2023/21015). Все образцы хранились при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Поскольку все образцы, полученные для лабораторного исследования, считаются потенциально инфицированными, при работе с ними учитывались требования СанПин 3.3686-21, СанПиН 2.1.3684-21 и методические указания МУ 1.3.2569-09.

При разработке набора использованы реактивы: Taq DNA Polymerase, recombinant ($5\text{ U}/\mu\text{L}$), Номер по каталогу: EP0406 (Thermo Scientific™, США); Taq Buffer (10X), с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 20 mM MgCl_2 , Номер по каталогу: B34 (Thermo Scientific™, США); Трегалоза, Номер CAS: 6138-23-4; Маннитол, Номер CAS: 69-65-8; БСА, Номер CAS: 9048-46-8; ПЭГ 20000, Номер CAS: 25322-68-3.

Растворы лиофилизировали в сублимационной сушилке Lyovarog L-300, производитель BUCHI (Швейцария).

Выделение образцов проводили с использованием метода магнитной сорбции, с протоколом, оптимизированным для выделения РНК/ДНК при помощи автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот KingFisher Flex with 96 Deep-well, с помощью любого коммерческого набора на основе магнитной сорбции, имеющего Регистрационное удостоверение [4, 8].

Аmplификация и детекция готовых смесей с добавлением к ним образцов проводились с помощью термоциклера Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лабораторизез, Инк.» (США) [3].

Результаты и обсуждение

Подбор концентраций компонентов для лиофилизации системы ПЦР. Используемые в настоящее время компоненты в процессе сублимационной сушилки включают в себя набор реагентов, содержащий химические или биохимические реагенты, необходимые для

проведения процесса: стеклообразователь, стабилизатор и др. [9, 13, 14]. Используемые нами реагенты при создании системы лиофилизованного набора подобраны после изучения литературы с учётом их физико-химических свойств согласно таблице 1.

Мастер-микс ПЦР готовили путём объединения следующих реагентов для реакций объёмом до 50 мкл: Taq Buffer для ПЦР — 10 мкл, Taq DNA Polymerase 0,5 мкл. смеси прямой праймер: обратный праймер: зонд добавляли в объёме 2,1 мкл, из расчёта на 1 пробу. Из компонентов для лиофилизации добавляли трегалозу в концентрациях из таблицы 1 в объёме 5,0 мкл, маннит с концентрациями 0,5 М в объёме 0,5 мкл, БСА 0,2 мкл, ПЭГ в концентрациях из таблицы 1 в объёме 7,5 мкл из расчёта на 1 пробу, в 4 повторах каждой комбинации смесей и воды.

Таблица 1

Концентрации реагентов для сублимационной сушилки

| Реагент | Концентрация реагентов | V, мкл (для получения 50 мкл смеси) |
|---|------------------------|-------------------------------------|
| БСА | 15 mg/ml | 0,62 |
| Прямой праймер | 12 μM | 2,1 |
| Обратный праймер | 12 μM | 2,1 |
| Зонд | 12 μM | 2,1 |
| Маннит | 0,5 М | 0,5 |
| Трегалоза | 100 mM | 5,0 |
| | 150 mM | |
| | 200 mM | |
| | 250 mM | |
| ПЭГ 20000 | 10% | 7,5 |
| | 15% | |
| | 20% | |
| | 25% | |
| Taq Buffer с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 20 mM MgCl_2 | 10x | 10,0 |
| Taq DNA Polymerase, recombinant | 5 U/ μL | 0,5 |
| Вода (RNase-free / DNase-free) | - | 19,58 |

Проверка на ингибирование приготовленных смесей с компонентами для лиофилизации. Проведение ПЦР выполняли с использованием реакционных смесей из таблицы 1 с использованием серии разведений синтетической ДНК HBV (положительного контрольного образца — ПКО). Результаты серии разведений концентраций ПКО_{разв1} $10^6\text{ ME}/\text{мл}$ и ПКО_{разв2} $10^5\text{ ME}/\text{мл}$ (рис. 2), где по оси абсцисс — количество циклов (Cycles), по оси ординат — уровень флуоресценции (RFU).

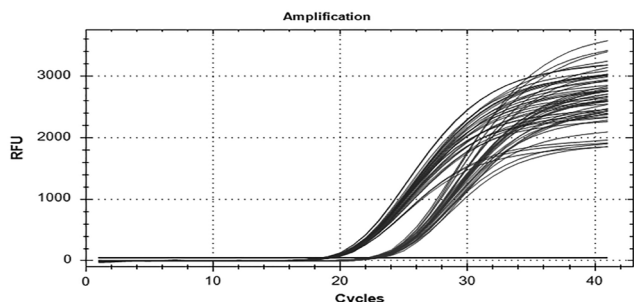


Рис. 2. Амплификация ПКО_{разв1} и ПКО_{разв2} с различными комбинациями в различной концентрации компонентов для лиофилизации. Зелёным цветом показано ПКО_{разв1} с тестируемыми композициями; фиолетовым цветом — ПКО_{разв2} с тестируемыми композициями

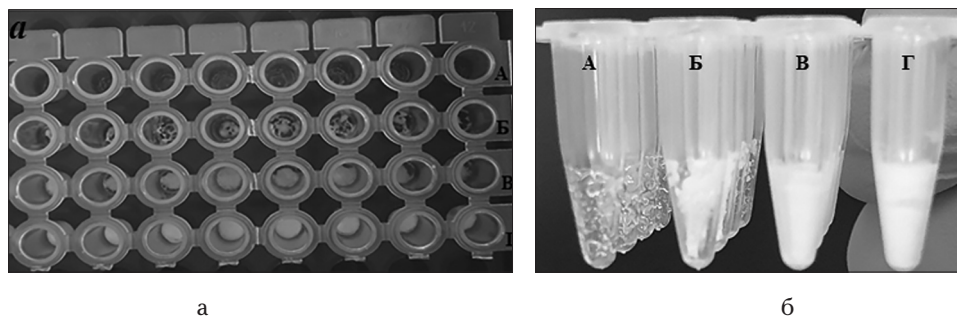


Рис. 3. Вид лиофилизированной системы реагентов ПЦР. а — вид сверху, ряд А — лиофилизированная система с ПЭГ, в концентрации 25%, ряд Б — лиофилизированная система с ПЭГ в концентрации 20%, ряд В — лиофилизированная система с ПЭГ в концентрации 15%, ряд Г — лиофилизированная система с ПЭГ в концентрации 10%. б — вид спереди, ряд А — лиофилизированная система с ПЭГ, в концентрации 25%, ряд Б — лиофилизированная система с ПЭГ в концентрации 20%, ряд В — лиофилизированная система с ПЭГ в концентрации 15%, ряд Г — лиофилизированная система с ПЭГ в концентрации 10%

ПЭГ 20000 лиофилировали в различных концентрациях в сочетании с трегалозой в концентрациях 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ и маннитолом в концентрации 0,5 М. ПЭГ 20000 в различных концентрациях имел различающийся внешний вид после высушивания (см. рис. 3). Добавленный полиэтиленгликоль в ряду А в концентрации 25% выглядел после сушки мокрым (вязкообразным), не было видно образования таблетки в центре. В ряду Б ПЭГ в концентрации 20% выглядел после сушки менее влажным на вид, чем 25%, но был в виде паутинки в центре. В ряду В с концентрацией ПЭГ 15% выглядел похожим на стандартную «таблетку», но она была в форме изогнутой сосульки с присутствием небольшой влажности. В ряду Г из всех подобранных концентраций ПЭГ 10% выглядел похожим на стандартную таблетку, плотно прилегающую к стенкам пробирки, без видимого увлажнения.

Хотя на образование таблетки так называемое «стеклование» оказывает свою роль сахара, в частности трегалоза; скорее всего, пробирки в ряду А, Б остались влажными по причине высокой концентрации ПЭГ.

Все реакционные смеси показали себя одинаково (см. рис. 1). Эти результаты указывают на то, что каждый состав ПЦР смеси с использованием компонентов для лиофилизации может обнаруживать синтетическую ДНК HBV. Основываясь на полученных и проанализированных результатах, мы приступили к лиофилизации, используя для тестирования и оптимизации предварительно смешанные варианты композиций из таблицы 1.

Проверка качества лиофилизации. Полученные смеси в объёме 50 мкл разносили с помощью механического дозатора в ПЦР плашку в несколько рядов и подвергали процессу сублимационной сушки. Вид лиофилизированной смеси ПЦР представлен на рисунке 3.

Полученные высушенные смеси протестированы на ПКО_{разв1} и ПКО_{разв2} (рис. 4).

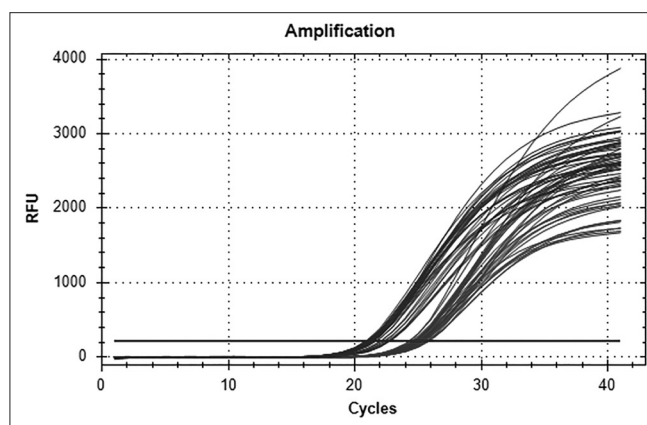


Рис. 4. Амплификация ПКО_{разв1} и ПКО_{разв2} с лиофилизированной смесью ПЦР в концентрации ПЭГ 10% и 15%

На основе полученных данных отмечено, что трегалоза в концентрации 200 мМ и 250 мМ даёт лучший результат. Обе выбранных концентрации трегалозы ото-

бражали схожесть с графиками контрольных реакций в жидком формате тех же смесей ПКО 10^6 МЕ/мл и ПКО 10^5 МЕ/мл. Для ПЭГ 20000 проведены те же испытания: и 10%-, и 15%-ная концентрация определены как наиболее подходящая ряд В и Г (см. рис. 3). Другие концентрации ПЭГ показали сомнительный результат. В процессе раскапывания смеси замечено, что при добавлении образцов в пробирках ряда А, Б растворение происходило достаточно долго и было неполное (часть высушенных фрагментов оставалась нерастворенной на дне пробирки), что сказывалось на результатах ПЦР, не наблюдалось пересечения графиков пороговой линии.

Решено отказаться от использования ПЭГ в концентрациях 20% и 25%, а остановиться на использовании 200 мМ и 250 мМ в сочетании с концентрациями ПЭГ 10% и 15%.

По полученным результатам после проверки на ПКО в двух разведениях и отобранных вариантах композиций, подготовлены образцы в количестве 50 проб с положительным результатом на HBV и 50 проб с отрицательным результатом по HBV, предварительно охарактеризованные по набору реагентов «ГепаЭК В» (АО «ЭКОлаб», Россия) (рис. 5).

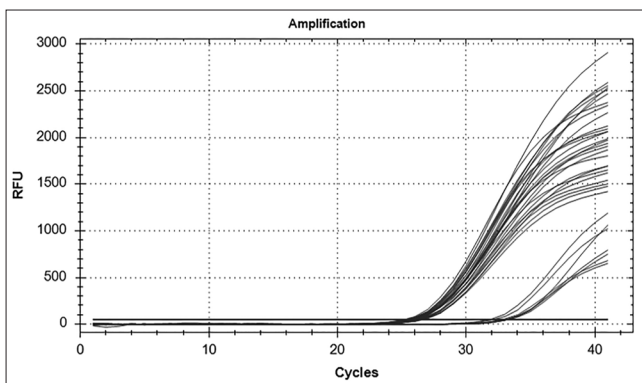


Рис. 5. Амплификация проверенных образцов HBV по набору реагентов «ГепаЭК В»

Протестированные образцы на HBV оказались практически одинаковыми по вирусной нагрузке (выходят на одинаковых циклах Ct 25-26), как следует из рисунка 5, но также определены слабые образцы [5]. Проверенные образцы ставили с лиофильно высушенными смесями. Количество добавляемых реагентов для растворения образующейся таблетки подобрано и использовано в объёме 50 мкл. Установлено, что таблетка при добавлении биологического агента способна полностью раствориться в 50 мкл раствора менее чем за 1 мин, для ряда В — за 20 секунд, для ряда Г — за 40 сек (см. рис. 2).

Выбранные концентрации в композиции проверены на положительных образцах HBV таблицы 2, где 100 мМ Трегалоза + 10% ПЭГ — Смесь 1, 150 мМ Трегалоза + 15% ПЭГ — Смесь 2, 200 мМ Трегалоза + 15% ПЭГ — Смесь 3, 250 мМ Трегалоза + 10% ПЭГ — Смесь 4.

Результаты, полученные с лиофильно высушенными смесями в пробирках, сравнивали с результатами, полученными со свежей смесью. Получены результаты для всех четырёх вариантов смеси: Смесь 1, Смесь 2, Смесь 3, Смесь 4: 50 образцов — положительные на ДНК HBV и 50 — отрицательные и имели аналогичные значения в сравнении с жидким форматом ПЦР тест-системы (см. рис. 4). С целью проверки сохранности зондов и ответа на вопрос, не подверглись ли они разрушению в процессе лиофилизации, поставлена ПЦР со смесями, где в качестве образца выступала вода, полученная из установки Millipore, в объёме 50 мкл. По результатам тестов все смеси продемонстрировали отрицательный результат.

Заключение

Результаты проведённых испытаний показали, что лиофилизаты, полученные с использованием смесей 1–4 из ряда комбинаций, обладают удовлетворительными свойствами в сравнении с обычным жидким составом (табл. 2). После подобранных предпочтительных и хорошо показавших себя вариантов реагентов дальнейшее исследование будет направлено на изучение их стабильности, с учётом последующих результатов, выявленных при их хранении.

Таблица 2

Значения порогового цикла 50 положительных образцов ВГБ в лиофилизированных смесях

| № образца | Смесь 1 | Смесь 2 | Смесь 3 | Смесь 4 |
|-----------|---------|---------|---------|---------|
| | Ct | | | |
| 1 | 25,94 | 25,81 | 25,82 | 26,01 |
| 2 | 25,79 | 25,66 | 25,67 | 25,85 |
| 3 | 25,90 | 25,77 | 25,78 | 25,97 |
| 4 | 25,67 | 25,54 | 25,55 | 25,74 |
| 5 | 25,86 | 25,73 | 25,74 | 25,93 |
| 6 | 25,53 | 25,40 | 25,41 | 25,60 |
| 7 | 25,74 | 25,61 | 25,62 | 25,81 |
| 8 | 25,50 | 25,37 | 25,38 | 25,56 |
| 9 | 25,74 | 25,61 | 25,62 | 25,80 |
| 10 | 26,08 | 25,95 | 25,96 | 26,14 |
| 11 | 25,63 | 25,50 | 25,51 | 25,70 |

| | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|
| 12 | 25,30 | 25,17 | 25,18 | 25,37 |
| 13 | 25,53 | 25,40 | 25,41 | 25,59 |
| 14 | 25,80 | 25,67 | 25,68 | 25,86 |
| 15 | 32,24 | 32,11 | 32,12 | 32,30 |
| 16 | 33,38 | 33,25 | 33,26 | 33,45 |
| 17 | 33,29 | 33,16 | 33,17 | 33,36 |
| 18 | 26,10 | 25,97 | 25,98 | 26,17 |
| 19 | 26,26 | 26,13 | 26,14 | 26,33 |
| 20 | 26,13 | 26,00 | 26,01 | 26,20 |
| 21 | 33,32 | 33,19 | 33,20 | 33,39 |
| 22 | 32,86 | 32,73 | 32,74 | 32,93 |
| 23 | 33,18 | 33,05 | 33,06 | 33,25 |
| 24 | 31,86 | 31,73 | 31,74 | 31,93 |
| 25 | 25,42 | 25,29 | 25,30 | 25,49 |
| 26 | 25,60 | 25,47 | 25,48 | 25,66 |
| 27 | 26,41 | 26,28 | 26,29 | 26,48 |
| 28 | 26,48 | 26,35 | 26,36 | 26,55 |
| 29 | 26,40 | 26,27 | 26,28 | 26,46 |
| 30 | 26,52 | 26,39 | 26,40 | 26,59 |
| 31 | 26,09 | 25,96 | 25,97 | 26,16 |
| 32 | 26,32 | 26,19 | 26,20 | 26,39 |
| 33 | 26,59 | 26,46 | 26,47 | 26,66 |
| 34 | 26,78 | 26,65 | 26,66 | 26,85 |
| 35 | 25,60 | 25,74 | 25,61 | 25,71 |
| 36 | 26,72 | 26,86 | 26,73 | 25,55 |
| 37 | 25,63 | 25,77 | 25,64 | 25,67 |
| 38 | 25,84 | 25,98 | 25,85 | 25,44 |
| 39 | 25,96 | 26,10 | 25,97 | 25,63 |
| 40 | 25,83 | 26,10 | 25,97 | 25,30 |
| 41 | 25,13 | 25,27 | 25,14 | 25,51 |
| 42 | 26,18 | 26,32 | 26,19 | 25,26 |
| 43 | 26,02 | 26,16 | 26,03 | 25,50 |
| 44 | 26,78 | 26,92 | 26,79 | 25,84 |
| 45 | 26,31 | 26,45 | 26,32 | 25,40 |
| 46 | 26,33 | 26,47 | 26,34 | 25,07 |
| 47 | 25,88 | 26,02 | 25,89 | 25,29 |
| 48 | 25,77 | 25,91 | 25,78 | 25,56 |
| 49 | 25,33 | 25,47 | 25,34 | 24,96 |
| 50 | 26,00 | 26,14 | 26,01 | 25,78 |

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании АО «ЭКОлаб», предоставившей оборудование для исследования и оказанной финансовой поддержке.

Финансирование. Исследование финансировалось АО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В., Марахова А.И. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков // Фармация. — 2017. — Т. 66. — № 1. — С. 14–18.
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году». URL: https://www.gospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=27779.
3. Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного обнаружения РНК вируса ВИЧ-1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Клиническая лабораторная диагностика. — 2023. — Т. 68. — № 5. — С. 298–304.
4. Жигалева О.Н., Ильин И.И., Марданлы С.Г., Марданлы С.С. Разработка набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала на основе магнитной адсорбции // Клиническая лабораторная диагностика. — 2023. — Т. 68. — № 10. — С. 650–657.
5. Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И. Разработка набора реагентов для выявления и количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. — 2023. — № 2. — С. 23–30.
6. Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И. Разработка набора реагентов с применением метода ПЦР для качественной идентификации ДНК вируса гепатита В // Клиническая лабораторная диагностика. — 2023. — Т. 68. — № 12. — С. 775–779.
7. Рекомендации МЗ РФ по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В. URL: https://www.ispbgmu.ru/images/home/universitet/Struktura/Kafedry/Kafedra_obshey_vrach_praktfamily_med/программа_ординаторов_2021/Рекомендации_по_лечению_гепатита_В.pdf (10 July 2024).
8. Чуликова А.Н., Попова Т.В., Киселева В.А. Исследование распространенности вирусов герпеса 6А и 6В в урогенитальных мазках // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2024. — Т. 29. — № 2. — С. 94–96.
9. Felix F. et al. Freeze-dried compositions for PCR and RT-PCR. Patent EU N EP2294222B1; 2011.
10. Forney-Stevens K.M., Bogner R.H., Pikal M.J. Addition of amino acids to further stabilize lyophilized sucrose-based protein formulations: I. Screening of 15 amino acids in two model proteins // Journal of pharmaceutical sciences. — 2016. — Vol. 105. — No. 2. — P. 697–704.

11. Hidenori K., Toshinori S., Yukitaka K. Recent development of optimization of lyophilization process // *Journal of Chemistry*. – 2019. – P. 1–14. doi: 10.1155/2019/9502856.
12. Kommineni N., Butreddy A., Sainaga Jyothi V.G.S., Angsantikul P. Freeze-drying for the preservation of immunoengineering products // *iScience*. – 2022. – Vol. 25. – No. 10. – P. 1–32. doi: 10.1016/j.isci.2022.105127.
13. Lee M.A. et al. Freeze-dried compositions for carrying out PCR and other biochemical reactions. Patent U.S. N US20110159497A1; 2011.
14. Lyophilized Reagent For PCR with UDG System to Protect Cross-Contamination. Patent KR N KR20140110138A; 2014.
15. Prado N.O., Lalli L.A., Blanes L., Zanette D.L., Aoki M.N. Lyophilization of molecular biology reactions: A review // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2023. – Vol. 23. – No. 4. – P. 480–496.
16. Ward K.R., Matejschuk P. The principles of freeze-drying and application of analytical technologies // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. – 2021. – P. 99–127.
17. World Health Organization. Global hepatitis report 2024. 15 June 2024. Available at: <https://www.who.int/publications/b/68511>.
18. World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. 20 June 2024. Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/154590>.
- kolichestvennogo opredeleniya RNK virusa immunodefitsita cheloveka 1 tipa (VICH-1) v klinicheskom materiale metodom P'TSR s gibridizatsionno-fluorestsentnoy detektsiyey. *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya* 2023; 2:23–30 (in Russian).
6. Zhigaleva ON, Mardanly SG, Gashenko TYU, Yermolayev II. Razrabotka nabora reagentov s primeneniym metoda P'TSR dlya kachestvennoy identifikatsii DNK virusa gepatita B. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2023; 68(12):775–779 (in Russian).
7. Rekomendatsii MZ RF po diagnostike i lecheniyu vzroslykh bol'nykh gepatitom B. URL: https://www.1spbgmu.ru/images/home/universitet/Struktura/Kafedry/Kafedra_obshey_vrach_praktfamily_med/programma_ordinatorov_2021/Rekomendatsii_po_lecheniyu_gepatita_V.pdf (10 July 2024) (in Russian).
8. Chulikova AN, Popova TV, Kiseleva VA. Issledovaniye rasprostranennosti virusov gerpesa 6A i 6B v urogenital'nykh mazkakh. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni* 2024; 29(2):94–96 (in Russian).
9. Felix F et al. Freeze-dried compositions for PCR and RT-PCR. Patent EU N EP2294222B1; 2011.
10. Forney-Stevens KM, Bogner RH, Pikal MJ. Addition of amino acids to further stabilize lyophilized sucrose-based protein formulations: I. Screening of 15 amino acids in two model proteins. *Journal of pharmaceutical sciences* 2016; 105(2):697–704.
11. Hidenori K, Toshinori S, Yukitaka K. Recent development of optimization of lyophilization process. *Journal of Chemistry* 2019:1–14. doi: 10.1155/2019/9502856.
12. Kommineni N, Butreddy A, Sainaga Jyothi VGS, Angsantikul P. Freeze-drying for the preservation of immunoengineering products. *iScience* 2022; 25(10):1–32. doi: 10.1016/j.isci.2022.105127.
13. Lee MA et al. Freeze-dried compositions for carrying out PCR and other biochemical reactions. Patent US N US20110159497A1; 2011.
14. Lyophilized Reagent For PCR with UDG System to Protect Cross-Contamination. Patent KR N KR20140110138A; 2014.
15. Prado NO, Lalli LA, Blanes L, Zanette DL, Aoki MN. Lyophilization of molecular biology reactions: A review. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2023; 23(4):480–496.
16. Ward KR, Matejschuk P. The principles of freeze-drying and application of analytical technologies. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2021:99–127.
17. World Health Organization. Global hepatitis report 2024. 15 June 2024. Available at: <https://www.who.int/publications/b/68511>.
18. World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. 20 June 2024. Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/154590>.

References

1. Blynskaya YeV, Tishkov SV, Alekseyev KV, Marakhova AI. Vspomogatel'nyye veshchestva v tekhnologii liofilizatsii peptidov i belkov. *Farmatsiya* 2017; 66(1):14–18 (in Russian).
2. Gosudarstvennyy doklad «O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2023 godu». URL: https://www.rosпотреbnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=27779 (in Russian).
3. Zhigaleva ON, Yermolayev II, Mardanly SG, Gashenko TYU. Razrabotka nabora reagentov dlya kachestvennogo obnaruzheniya RNK virusa VICH-1 metodom polimeraznoy tsepnoy reaksii v rezhime real'nogo vremeni. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2023; 68(5):298–304 (in Russian).
4. Zhigaleva ON, Il'in II, Mardanly SG, Mardanly SS. Razrabotka nabora reagentov dlya vydeleniya nukleinovykh kislot iz klinicheskogo materiala na osnove magnitnoy adsorbtsii. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2023; 68(10):650–657 (in Russian).
5. Zhigaleva ON, Mardanly SG, Gashenko TYU, Yermolayev II. Razrabotka nabora reagentov dlya vyyavleniya i

FREEZE DRYING REAGENT SELECTION FOR DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS NUCLEIC ACIDS BY PCR

S.G. MARDANLY^{1,2}, I.I. ERMOLAEV¹, I.I. ILIN^{1,2}

¹JSC «EKOlab», Elektrogosk;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), Orekhovo-Zuyevo

The polymerase chain reaction (PCR) is a well-established methodology for the diagnosis of a range of infectious diseases. The quality of the reagents that comprise the PCR system is significantly compromised when they are subjected to improper transportation or temperature conditions. The freeze-drying method is designed to solve this problem by producing products with improved stability. The study included 100 blood serum samples, of which 50 were positive for the hepatitis B virus (HBV/НВV) and 50 were negative for this infection. The samples were tested for the presence of the virus using polymerase chain reaction (PCR) with the HepaEK B kit (JSC «EKOlab» RZN 2023/21015, Russian Federation). The samples were lyophilized using a laboratory freeze dryer, the Lyovapor L-300 (BUCHI, Switzerland). The results of the selection process for the requisite components for the freeze-drying of the reagent set designated as «HepaEK B» are presented herein. The research conducted allowed for the establishment of satisfactory reagent mixtures among the set of tested variants in concentrations of substances, namely 100 mM trehalose + 10% PEG, 150 mM trehalose + 15% PEG, 200 mM trehalose + 15% PEG, and 250 mM trehalose + 10% PEG. The data obtained suggest the potential for further research in the field of freeze drying for PCR systems. A review of the literature on the selection of reagents for lyophilization of PCR mixtures enabled the attainment of the requisite outcomes. The ability to store a PCR reagent mixture in a lyophilized state is essential for domestic companies seeking to ensure the stability of their products for clinical laboratory diagnostics and maintain their quality.

Keywords: nucleic acids, hepatitis B virus, polymerase chain reaction (PCR), lyophilization.

Address:

Ermolaev I.I.

laboratory assistant of the research and production department
of PCR, JSC «EKOlab»

E-mail: blacshadow99@gmail.com

Для цитирования:

Марданлы С.Г., Ермолаев И.И., Ильин И.И. Подбор реагентов сублимационной сушки для выявления нуклеиновых кислот вируса гепатита В методом ПЦР. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):60–67.

For citation:

Mardanly S.G., Ermolaev I.I., Ilin I.I. Freeze drying reagent selection for detection of hepatitis B virus nucleic acids by PCR. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4): 60–67 (in Russian).

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АЛКИЛ-2-ГИДРОКСИБЕНЗИЛДИФЕНИЛФОСФОНИЕВЫХ СОЛЕЙ

А.П. ЛЮБИНА*, А.Д. ВОЛОШИНА, С.К. АМЕРХАНОВА, А.С. САПУНОВА,
Д.А. ТАТАРИНОВ, В.Ф. МИРОНОВ

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань

В настоящей работе были исследованы алкил-2-гидроксibenзилдифенилфосфониевые соли, обладающие двойным — антимикробным и противоопухолевым действием. Исследуемые соединения проявили высокоселективное цитотоксическое действие против раковых клеточных линий промиелоцитарной лейкемии, карциномы предстательной железы и аденокарциномы яичника. На примере соединения-лидера 6.5 было показано, что механизм цитотоксического действия тестируемых соединений на раковые клетки M-HeLa может быть обусловлен ДНК-повреждающим действием, приводящим к остановке клеточного цикла в фазе G1, последующей индукции апоптоза по митохондриальному пути, вызванного усилением генерации активных форм кислорода и снижением потенциала митохондриальной мембраны. Полученные результаты позволяют рассматривать исследованные фосфониевые соли в качестве новых эффективных противораковых митохондриально направленных агентов.

Ключевые слова: противоопухолевые средства, фосфониевые соли, апоптоз, активные формы кислорода, повреждение ДНК, клеточный цикл.

Введение

По статистике ВОЗ, онкологические заболевания остаются одной из основных причин смерти в мировой практике, и почти каждый пятый человек на протяжении всей жизни подвержен риску заболеть раком [20]. Одной из стратегий лечения рака является химиотерапия. Но, как правило, лекарственные средства, применяемые в лечении этого заболевания, являются токсичными для всего организма [21]. Кроме того, возникает все больше случаев лекарственной устойчивости раковых клеток, что также снижает уровень выживаемости пациентов [22]. В связи с этим актуален поиск новых селективных противоопухолевых агентов и их изучение.

Одними из многообещающих высокоактивных соединений являются фосфониевые соли [15]. Такие вещества представляют собой липофильные катионы, способные проникать через мембраны клеток живых организмов за счёт разницы мембранного потенциала

($\Delta\Psi$). Из-за высокого мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) фосфониевые соли могут накапливаться в этих органеллах. Известно, что в раковых клетках наблюдается повышенный $\Delta\Psi_m$ [13], благодаря чему становится возможным создание селективного противоопухолевого агента с использованием липофильных катионов [12].

Ранее нами был получен и исследован ряд производных фосфониевых солей (алкил-2-гидроксibenзилдифенилфосфоний хлоридов), который обладает высокой антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий и грибов [17]. Кроме того, данные вещества продемонстрировали высокую цитотоксичность и селективность в отношении клеток карциномы шейки матки M-HeLa. Так, IC 50 (концентрация полумаксимального ингибирования) соединения-лидера 6.5 на данной линии составляла 2,6 мкМ, а IC (индекс селективности), рассчитанный относительно гепатоцитоподобных клеток Chang liver, достигал 16.4. На примере соединения-лидера была доказана способность этих фосфониевых солей индуцировать апоптоз, характеризуемый снижением мембранного потенциала митохондрий в клетках M-HeLa.

Целью настоящей работы явилось более детальное изучение механизма действия алкил-2-гидроксibenзилдифенилфосфоний хлоридов, а также расширение

© 2024 г. Любина А.П., Волошина А.Д., Амерханова С.К., Сапунова А.С., Татаринов Д.А., Миронов В.Ф.

* Автор для переписки:

Любина Анна Павловна

младший научный сотрудник ИОФХ им. А.Е. Арбузова — ОСП ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

E-mail: aplyubina@gmail.com

спектра их цитотоксического действия в отношении раковых клеточных линий различного происхождения.

Материалы и методы

В работе были исследованы цитотоксические свойства ряда производных фосфониевых солей (алкил-2-гидроксibenзилдифенилфосфоний хлориды). Вещества отличаются длиной алкильного заместителя у атома фосфора.

В работе были использованы 9 клеточных линий человека. Клеточные линии A 549 (карцинома легкого), M-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки, суб-линия HeLa клон M-HeLa 11), HuTu 80 (аденокарцинома двенадцатиперстной кишки), RPMI 1788 (лейкоциты периферической крови здорового донора), HL-60 (периферическая кровь, промиелоцитарная лейкемия) были получены из Института цитологии РАН (Россия). Клетки Chang liver (гепатоцитоподобные клетки) получены из Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи (Россия). Клеточные линии SK-OV-3 (аденокарцинома яичника), A-375 (злокачественная меланома), DU-145 (карцинома предстательной железы) — из клеточного репозитория CSL (Cell line service) (Германия).

Клеточные линии M-HeLa, HuTu80, A 549, Chang liver, Du-145 культивировали в стандартной среде Игла-МЕМ (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки 1%-ного раствора незаменимых аминокислот (ПанЭко, Россия). Клетки RPMI 1788 и HL-60 выращивали на среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки. Клетки SK-OV-3 культивировали на среде ДМЕМ F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки и 2 мМ L-глутамина. Клетки A-375 выращивали на среде ДМЕМ с глутамином (ПанЭко, Россия), с добавлением 1% незаменимых аминокислот и 10% фетальной бычьей сыворотки. Все клеточные линии культивировали в инкубаторе при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Цитотоксичность соединений оценивали с помощью МТТ теста. Расчет IC₅₀ проводился с помощью онлайн-калькулятора: MLA — «Калькулятор Quest Graph™ IC50» [2]. В качестве препарата сравнения использовался Доксрубицин (Sigma-Aldrich, США). Индекс селективности (ИС) соединений определяли как отношение их IC₅₀ для нормальной клеточной линии к IC₅₀ для опухолевых клеток. ИС рассчитан относительно двух условно нормальных клеточных линий: Chang liver и RPMI 1788.

Измерение клеточного окислительного стресса проводили с использованием красителя CellROX® Deep Red (Invitrogen, США) согласно стандартному протоколу, предоставленному производителем. Результаты получали с помощью проточного цитометра (Guava easy Cyte, MERCK, США).

Анализ клеточного цикла выполняли согласно опубликованной методике [10]. Результаты получали методом проточной цитометрии (Guava easy Cyte, MERCK, США).

Оценку адгезивных свойств клеток в режиме реального времени проводили при помощи xCELLigence S16 Real-time Analysis System RTCA (Acea Biosciences, США) согласно опубликованной методике [10]. Для анализа результатов использовали программное обеспечение RTCA Software 2.0.

Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза и маркеров повреждения ДНК/Генотоксичности проводили с использованием соответствующих наборов (MILLIPLEX® 7-plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit и MILLIPLEX® MAP 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit (Merck, США) согласно стандартным протоколам, предоставленным производителем. Общий уровень белка в образцах лизированных клеток измеряли с использованием реагента Бредфорда (Bio-Rad, США). Значения интенсивности флуоресценции получали с помощью системы Luminex® MAGPIX® (Merck, США).

Панель MILLIPLEX® 7-plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit позволяет определить такие маркеры раннего апоптоза, как Akt (pS473), BAD (Ser112), Bcl-2 (Ser70), p53 (Ser46), JNK (Thr183/Tyr185), Active Caspase-8 (Asp384), Active Caspase-9 (Asp315). Набор MILLIPLEX® MAP 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit позволяет определить фосфорилированные Chk1 (Ser345), Chk2 (Thr68), H2A.X (Ser139), p53 (Ser15), а также общий уровень ATR, MDM2 and p21.

Статистический анализ данных выполнен с использованием программы Microsoft Office Excel 2016. Значимость различий средних значений определена с применением U-критерия Манна — Уитни (p ≤ 0,01) с учетом поправки Бонферрони. Табличные и графические данные содержат средние значения и стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

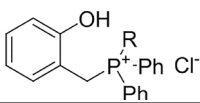
Исследуемые фосфониевые соли, которые ранее продемонстрировали противоопухолевую активность,

протестировали на более широком спектре клеточных линий с целью выявления наиболее чувствительных к веществам клеток. В результате было выявлено, что клетки карциномы предстательной железы (Du-145), аденокарциномы яичника (SK-OV-3) и промиелоцитарной лейкемии (HL-60) наиболее чувствительны к исследуемым соединениям. Так, в отношении клеток Du-145 IC_{50} наиболее активного соединения 6.5 составляла 3,9 мкМ, а $IC_{Chang\ liver}$ – 11,5 (табл. 1, 3). В отношении

клеток HL-60 IC_{50} для соединения 6.3 составляет 4,1 мкМ, а $IC_{Chang\ liver}$ и $IC_{RPMI\ 1788}$ – 11,3 и 3,8 соответственно (табл. 2, 3, 4). Наиболее чувствительными оказались клетки SK-OV-3, IC_{50} в отношении данной линии для соединения 6.5 составляла 2 мкМ (табл. 1). На этой линии проявляется и высокая селективность данного соединения по сравнению со всеми протестированными условно-нормальными клетками ($IC_{Chang\ liver} = 21,4$; $IC_{RPMI\ 1788} = 12$) (табл. 3, 4).

Таблица 1

Цитотоксичность исследуемых соединений в отношении адгезивных клеточных культур

| соединение  | IC_{50} , мкМ | | | | | |
|---|-----------------|----------|----------|----------|----------|--------------|
| | A 549 | A-375 | Du-145 | SK-OV-3 | HuTu-80 | Chang liver* |
| 6.1 R = C ₆ H ₁₃ | 98,5±9,7 | 40,4±4,5 | 49,2±5,9 | 35,3±9,1 | 55,2±5,1 | 65,3 ± 5,1 |
| 6.2 R = C ₇ H ₁₅ | 35,3±3,1 | 11,7±2,2 | 27,1±3,2 | 16,5±2,3 | 32,0±3,0 | 41,6 ± 3,5 |
| 6.3 R = C ₈ H ₁₇ | 25,5±2,2 | 15,1±1,3 | 17,1±2,5 | 9,3±1,2 | 13,2±1,1 | 46,3 ± 3,8 |
| 6.4 R = C ₁₀ H ₂₁ | 51,9±5,0 | 5,9±0,6 | 3,9±0,4 | 2,6±0,5 | 11,1±1,0 | 45,7 ± 3,6 |
| 6.5 R = C ₁₂ H ₂₅ | 28,1±2,8 | 4,9±0,5 | 3,5±0,5 | 2±0,1 | 4,8±0,5 | 42,8 ± 3,3 |
| 6.6 R = C ₁₄ H ₂₉ | 49,4±4,8 | 10,5±1,2 | 11,8±2,1 | 5,4±0,9 | 6,2±0,6 | 42,3 ± 3,4 |
| 6.7 R = C ₁₆ H ₃₃ | 62,6±6,2 | 14,8±1,3 | 15,8±1,4 | 4,9±0,6 | 6,5±0,6 | 45,2 ± 3,8 |
| 6.8 R = C ₁₈ H ₃₇ | 93,5±9,0 | 24,6±2,5 | 27,3±3,9 | 22,6±1,9 | 53,1±4,9 | 69,0 ± 5,5 |
| Доксорубицин | 3,0±0,2 | 1,3±0,1 | 0,9±0,1 | 0,5±0,1 | 3,0±0,2 | 3,0±0,3 |

Примечание: * – данные опубликованы [17].

Таблица 2

Цитотоксичность исследуемых соединений в отношении суспензионных клеточных культур

| № соединения | IC_{50} , мкМ | |
|--------------|-----------------|-----------|
| | HL-60 | RPMI 1788 |
| 6.1 | 35,5±5,5 | 32,0±2,6 |
| 6.2 | 7,7±1,2 | 10,8±2,2 |
| 6.3 | 4,1±0,3 | 15,6±6,5 |
| 6.4 | 5,9±1,6 | 19,6±3,6 |
| 6.5 | 6,43±1,13 | 23,9±5,6 |
| 6.6 | 15,6±3,6 | 39,0±5,9 |
| 6.7 | 6,8±1,1 | 17,6±2,5 |
| 6.8 | 12,4±0,9 | 35,4±4,6 |
| Доксорубицин | 1,7±1,89 | 3,25±0,37 |

Таблица 3

Индекс селективности противоопухолевого действия исследуемых соединений, рассчитанный относительно IC_{50} для клеточной линии Chang liver

| № соединения | A 549 | A-375 | Du-145 | SK-OV-3 | HuTu 80 | HL-60 |
|--------------|-------|-------|--------|---------|---------|-------|
| 6.1 | 0,7 | 1,6 | 1,3 | 1,8 | 1,2 | 1,8 |
| 6.2 | 1,2 | 3,6 | 1,5 | 2,5 | 1,3 | 5,4 |

| | | | | | | |
|------------|-----|-----|------|------|-----|------|
| 6.3 | 1,8 | 3,1 | 2,7 | 5,0 | 3,5 | 11,3 |
| 6.4 | 0,9 | 7,6 | 11,5 | 17,9 | 4,1 | 7,7 |
| 6.5 | 1,5 | 8,8 | 12,3 | 21,4 | 8,9 | 6,7 |
| 6.6 | 0,9 | 4,0 | 3,6 | 7,8 | 6,8 | 2,7 |
| 6.7 | 0,7 | 3,1 | 2,9 | 9,2 | 7 | 6,7 |
| 6.8 | 1,4 | 2,8 | 2,5 | 3,1 | 1,3 | 5,6 |
| Доксорубин | 1 | 2,3 | 3,4 | 6,0 | 1 | 1,8 |

Таблица 4

Индекс селективности противоопухолевого действия исследуемых соединений, рассчитанный относительно IC₅₀ для клеточной линии RPMI-1788

| № соединения | A 549 | A-375 | Du-145 | SK-OV-3 | HuTu 80 | HL-60 |
|--------------|-------|-------|--------|---------|---------|-------|
| 6.1 | 0,3 | 0,8 | 0,6 | 0,9 | 0,6 | 0,9 |
| 6.2 | 0,3 | 0,9 | 0,4 | 0,7 | 0,3 | 1,4 |
| 6.3 | 0,6 | 1,0 | 0,9 | 1,7 | 1,2 | 3,8 |
| 6.4 | 0,4 | 3,3 | 4,9 | 7,7 | 1,8 | 3,3 |
| 6.5 | 0,9 | 4,9 | 6,9 | 12,0 | 5,0 | 3,7 |
| 6.6 | 0,8 | 3,7 | 3,3 | 7,2 | 6,3 | 2,5 |
| 6.7 | 0,3 | 1,2 | 1,1 | 3,6 | 2,7 | 2,6 |
| 6.8 | 0,4 | 1,4 | 1,3 | 1,6 | 0,7 | 2,9 |
| Доксорубин | 1,1 | 2,5 | 3,7 | 6,5 | 1,1 | 1,9 |

Ранее нами были продемонстрированы индукция апоптоза и снижение митохондриального мембранного потенциала в клетках M-HeLa при воздействии соединения 6.5 [17]. Поэтому для выявления возможной причины апоптоза и пути, по которому этот процесс протекает, был проведен анализ семи маркеров раннего апоптоза. Результаты анализа представлены на рисунке 1.

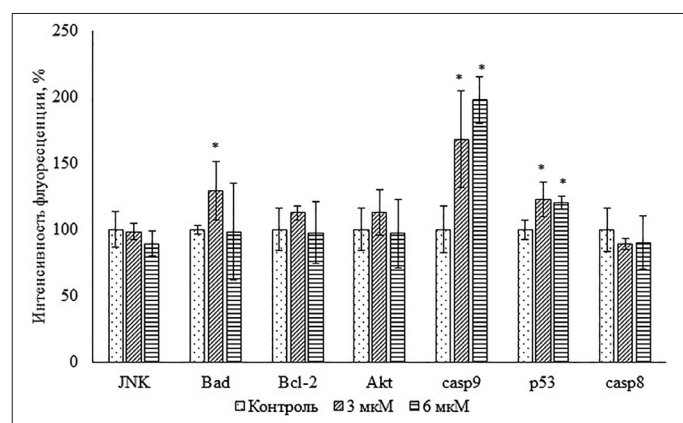


Рис. 1. Мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза в клетках M-HeLa после 24 ч воздействия соединения 6.5. * — $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом

Полученные данные указывают на то, что апоптоз протекает по внутреннему пути активации

каспазы-9 (увеличение флуоресценции данного белка в опытных образцах), в котором гибель клеток происходит из-за дисфункции митохондрий, а не по внешнему (рецептор-зависимому) пути, связанному с активацией каспазы-8 [5]. Также стоит отметить увеличение флуоресценции проапоптотического белка Bad в клетках, обработанных исследуемым соединением 6.5 в концентрации 3 мкМ. Этот белок способствует гибели клеток, связываясь с антиапоптотическим белком Bcl-2 [8]. Стоит также отметить увеличение уровня флуоресценции маркера p53, который, как известно, останавливает клеточный цикл и запускает апоптоз в ответ на повреждения ДНК [19].

Активные формы кислорода (АФК) образуются в клетках как продукт нормального метаболизма [16], но значительное увеличение их количества может привести к неблагоприятным для клетки последствиям, таким как окисление липидов, белков, повреждению ДНК и апоптозу [14]. Полученные ранее результаты, свидетельствующие о митохондриальном действии соединений и возможном повреждении ДНК, позволяют предположить, что в клетках усиливается генерация АФК. Действительно, нами было продемонстрировано увеличение общего уровня АФК в клетках M-HeLa при воздействии соединения 6.5 (рис. 2).

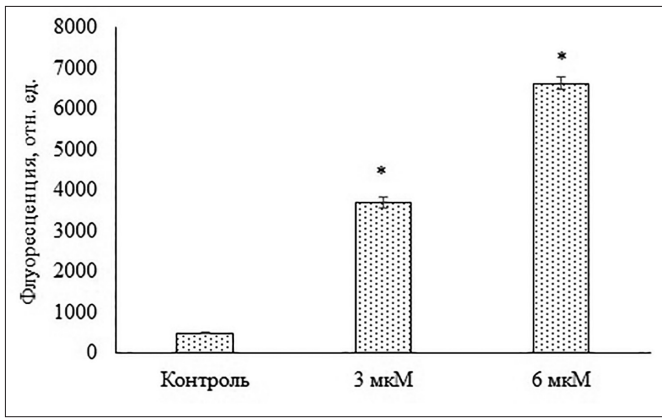


Рис. 2. Уровень АФК в клетках М-HeLa после 24 ч обработки соединением 6.5. * – $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом

Определение цитотоксичности соединений с применением МТТ реагента дает возможность оценить эффект веществ лишь в одной точке времени (в данном случае через 24 часа). Для оценки влияния соединений на пролиферацию клеток в режиме реального времени мы использовали систему xCELLigence. На рисунке 3 представлен график зависимости клеточного индекса от времени. Клеточный индекс (CI) — это безразмерный

параметр, который основывается на изменении величины электрического импеданса и характеризует биологическое состояние клеток, включая количество клеток, их жизнеспособность, морфологию и степень адгезии [9].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект 6.5 в концентрации, близкой к IC_{50} (3 мкМ), носит преимущественно цитостатический характер: кривая CI почти параллельна оси абсцисс, находится ниже контрольного уровня. При увеличении концентрации в два раза (6 мкМ) заметен цитотоксический эффект, который проявляется через 10 часов после воздействия вещества. Надо отметить, что в первые 10 часов после обработки клеток соединением 6.5 наблюдается увеличение CI выше контрольного уровня, а затем — его снижение. Такой характер кривой описывается в работе Abassi Y.A. et al. для соединений, ингибирующих трансляцию белков или влияющих на синтез ДНК. Как правило, такие соединения приводят к остановке клеточного цикла при переходе из G1-фазы в S-фазу [3]. Эти результаты подтверждаются данными, полученными методом точной цитометрии (рис. 4). В этом случае отмечается достоверное увеличение доли клеток в фазе G1 по сравнению с контролем.

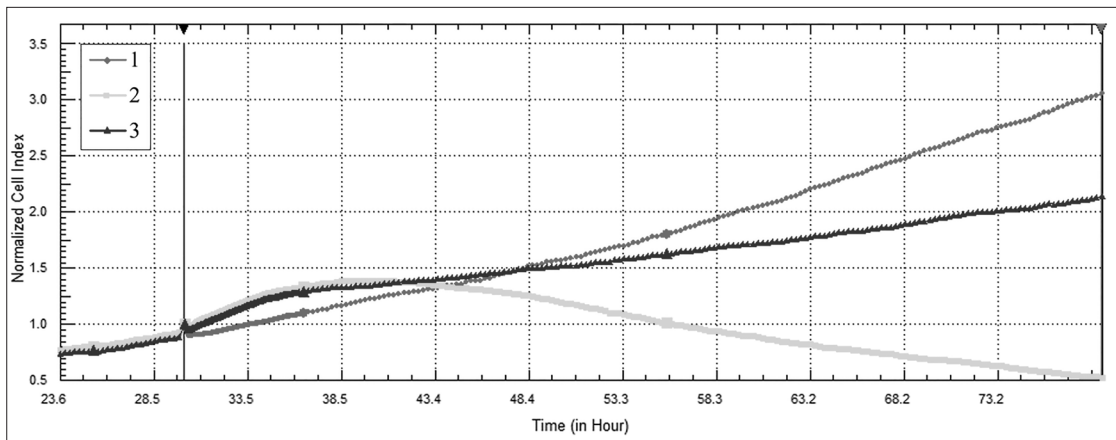


Рис. 3. Изменение адгезивных свойств клеток М-HeLa при воздействии разных концентраций соединения 6.5: 1 — контроль, 2 — 6 мкМ, 3 — 3 мкМ

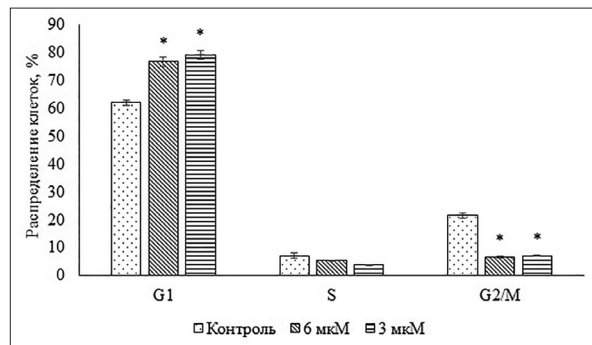


Рис. 4. Влияние соединения 6.5 на клеточный цикл клеток М-HeLa. * – $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом

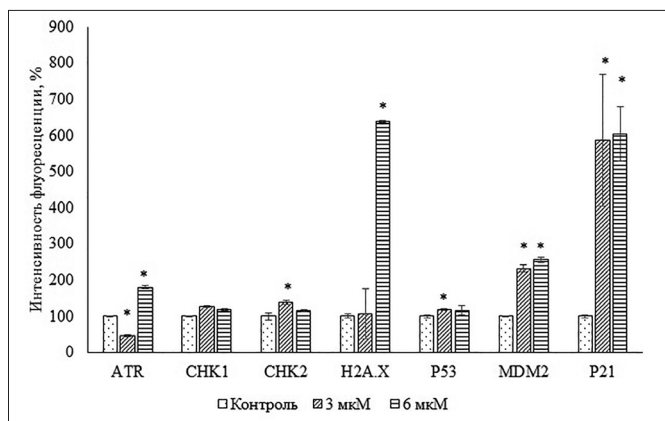


Рис. 5. Мультиплексный анализ маркеров повреждения ДНК/генотоксичности в клетках М-HeLa после воздействия соединения 6.5. * – $p < 0,01$ при сравнении с контрольным образцом

Так как ранее нами было продемонстрировано увеличение уровня флуоресценции белка p53, было целесообразно более подробно рассмотреть маркеры повреждения ДНК в клетках М-HeLa. Результаты анализа маркеров повреждения ДНК представлены на рисунке 5. При воздействии 6.5 в концентрации 6 мкМ на клетки М-HeLa наблюдалось увеличение флуоресценции фосфорилированного H2A.X. Этот гистон является маркером двухцепочечных разрывов ДНК [4]. Он быстро накапливается в местах повреждения ДНК и принимает участие в их репарации [6]. В ответ на двухцепочечные разрывы ДНК активируется также серин/треониновая протеинкиназа АТМ, субстратом которого является киназа контрольных точек CHK2 [11]. В результате этого приостанавливается переход клеток в S-фазу с помощью белка-супрессора опухоли p53 и ингибитора циклинзависимой киназы p21 [7]. Повышенный уровень флуоресценции перечисленных маркеров CHK2, p53 и p21 наблюдался при воздействии соединения 6.5. Функцию p53 может подавлять проопухолевый белок MDM2 [18]. Но несмотря на повышенный уровень этого белка в опытных образцах, даже небольшое количество p53 способно активировать p21, что приводит к остановке клеточного цикла [1].

Заключение

Исследованные производные фосфониевых солей, ранее продемонстрировавшие высокую противоопухолевую активность в отношении клеток карциномы шейки матки М-HeLa, оказались также эффективны и высокоселективны в отношении раковых клеточных линий предстательной железы, яичников и лейкемии. Противоопухолевый эффект исследуемых соединений, вероятно, обусловлен их митохондриально направленным

и ДНК-повреждающим воздействием, которое приводит к снижению митохондриального мембранного потенциала, накоплению активных форм кислорода, остановке клеточного цикла и запуску митохондриального апоптоза. Таким образом, исследованный ряд соединений может представлять интерес в качестве основы для создания высокоэффективных противоопухолевых агентов.

Литература

1. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена p53 // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 447–516.
2. AAT Bioquest, Inc: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (Дата обращения 18.01.2023).
3. Abassi Y.A., Xi B., Zhang W., Ye P., Kirstein S.L., Gaylord M.R., Feinstein S.C., Wang X., Xu X. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects // Chemistry & biology. – 2009. – Vol. 16. – No. 7. – P. 712–723.
4. Abbas I., Badran G., Verdin A., Ledoux F., Roumie M., Guidice J.M.L., Courcot D., Garçon G. In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM2.5 using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation // Environmental research. – 2019. – Vol. 171. – P. 510–522.
5. Green D.R., Llambi F. Cell death signaling // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2015. – Vol. 7. – No. 12. – a006080. doi: 10.1101/cshperspect.a006080.
6. Ismail I.H., Hendzel M.J. The γ -H2A. X: Is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? // Environmental and molecular mutagenesis. – 2008. – Vol. 49. – No. 1. – P. 73–82.
7. Karimian A., Ahmadi Y., Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage // DNA repair. – 2016. – Vol. 42. – P. 63–71.
8. Kelekar A., Chang B.S., Harlan J.E., Fesik S.W., Thompson C.B. Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL // Molecular and cellular biology. – 1997. – Vol. 17. – No. 12. – P. 7040–7046.
9. Kho D., MacDonald C., Johnson R., Unsworth C.P., O'Carroll S.J., Du Mez E., Angel C.E., Graham E.S. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time // Biosensors. – 2015. – Vol. 5. – No. 2. – P. 199–222.
10. Mamedov V.A. Zhukova N.A., Voloshina A.D., Syakaev V.V., Beschastnova T.N., Lyubina A.P., Amerhanova S.K., Samigullina A.I., Gubaidullin A.T., Buzyurova D.N., Rizvanov I.Kh., Sinyashin O.G. Synthesis of morpholine-, piperidine-, and N-substituted piperazine-coupled 2-(Benzimidazol-2-yl)-3-arylquinoxalines as novel potent antitumor

- agents // *ACS Pharmacology & Translational Science*. — 2022. — Vol. 5. — No. 10. — P. 945–962.
11. Manic G., Obrist F., Sistigu A., Vitale I. Trial watch: targeting ATM—CHK2 and ATR—CHK1 pathways for anticancer therapy // *Molecular & cellular oncology*. — 2015. — Vol. 2. — No. 4. — e1012976. doi: 10.1080/23723556.2015.1012976.
 12. Mansour S.T., Hashem A.I., Abd-El-Maksoud M.A., El-Hussieny M., El-Makawy A.I., Abdel-Aziem S.H., Soliman F.M. The synthesis and antineoplastic activities of thiaziridine, sulfidomethylphosphonium, and dithiaphosphitane-sulfide against the Ehrlich ascites carcinoma // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. — 2022. — Vol. 36. — No. 3. — P. 536–552.
 13. Modica-Napolitano J.S., Aprile J.R. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells // *Advanced drug delivery reviews*. — 2001. — Vol. 49. — No. 1–2. — P. 63–70.
 14. Reczek C.R., Chandel N.S. The two faces of reactive oxygen species in cancer // *Annual review of cancer biology*. — 2017. — Vol. 1. — No. 1. — P. 79–98.
 15. Ross M.F., Da Ros T., Blaikie F.H., Prime T.A., Porteous C.M., Severina I.I., Skulachev V.P., Kjaergaard H.G., Smith R.A.J., Murphy M.P. Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells // *Biochemical journal*. — 2006. — Vol. 400. — No. 1. — P. 199–208.
 16. Sabharwal S.S., Schumacker P.T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? // *Nature Reviews Cancer*. — 2014. — Vol. 14. — No. 11. — P. 709–721.
 17. Terekhova N.V., Tatarinov D.A., Shaihtudinova Z.M., Pashirova T.N., Lyubina A.P., Voloshina A.D., Sapunova A.S., Zakharova L.Ya., Mironov V.F. Design and synthesis of amphiphilic 2-hydroxybenzylphosphonium salts with antimicrobial and antitumor dual action // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. — 2020. — Vol. 30. — No. 13. — Art. 127234. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127234.
 18. Wang S., Zhao Y., Aguilar A., Bernard D., & Yang C.Y. Targeting the MDM2—p53 protein—protein interaction for new cancer therapy: progress and challenges // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. — 2017. — Vol. 7. — No. 5. — a026245. doi: 10.1101/cshperspect.a026245.
 19. Williams A.B., Schumacher B. p53 in the DNA-damage-repair process // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. — 2016. — Vol. 6. — No. 5. — a026070. doi: 10.1101/cshperspect.a026070.
 20. World Health Organization Cancer. 2022: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (Дата обращения 05.03.2023).
 21. Xie M., Liu D., Yang Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification // *Open biology*. — 2020. — Vol. 10. — No. 7. — Art. 200004. doi: 10.1098/rsob.200004.
 22. Zhu S., Wang X., Jiang H. Systematic reversal of drug resistance in cancer // *Targets*. — 2024. — Vol. 2. — No. 3. — C. 250–286.
- ## References
1. Zheltukhin AO, Chumakov PM. Povsednevnyye i industriyemyye funktsii gena r53 Uspekhi biologicheskoy khimii 2010; 50:447–516 (in Russian)
 2. AAT Bioquest, Inc. URL: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (Date of access 18.01.2023)
 3. Abassi YA, Xi B, Zhang W, Ye P, Kirstein SL, Gaylord MR, Feinstein SC, Wang X, Xu X. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chemistry & biology* 2009; 16(7):712–723.
 4. Abbas I, Badran G, Verdin A, Ledoux F, Roumie M, Guidice JML, Courcot D, Garçon G. In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM2.5 using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environmental research* 2019; 171:510–522.
 5. Green DR, Llambi F. Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2015; 7(12):a006080. doi: 10.1101/cshperspect.a006080.
 6. Ismail IH, Hendzel MJ. The γ -H2A. X: Is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environmental and molecular mutagenesis* 2008; 49(1):73–82.
 7. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA repair* 2016; 42:63–71.
 8. Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB. Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Molecular and cellular biology* 1997; 17(12):7040–7046.
 9. Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth CP, O'Carroll SJ, Du Mez E, Angel CE, Graham ES. Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors* 2015; 5(2):199–222.
 10. Mamedov VA Zhukova NA, Voloshina AD, Syakaev VV, Beschastnova TN, Lyubina AP, Amerhanova SK, Samigullina AI, Gubaidullin AT, Buzyurova DN, Rizvanov IKh, Sinyashin OG. Synthesis of morpholine-, piperidine-, and N-substituted piperazine-coupled 2-(Benzimidazol-2-yl)-3-arylquinoxalines as novel potent antitumor agents. *ACS Pharmacology & Translational Science* 2022; 5(10):945–962.
 11. Manic G, Obrist F, Sistigu A, Vitale I. Trial watch: targeting ATM—CHK2 and ATR—CHK1 pathways for anticancer therapy. *Molecular & cellular oncology* 2015; 2(4):e1012976. doi: 10.1080/23723556.2015.1012976.
 12. Mansour ST, Hashem AI, Abd-El-Maksoud MA, El-Hussieny M, El-Makawy AI, Abdel-Aziem SH, Soliman FM. The synthesis and antineoplastic activities of thiaziridine, sulfidomethylphosphonium, and dithiaphosphitane-sulfide against the Ehrlich ascites carcinoma. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2022; 36(3):536–552.

13. Modica-Napolitano JS, Aprile JR. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Advanced drug delivery reviews* 2001; 49(1):2:63–70.
14. Reczek CR, Chandel NS. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annual review of cancer biology* 2017; 1(1):79–98.
15. Ross MF, Da Ros T, Blaikie FH, Prime TA, Porteous CM, Severina II, Skulachev VP, Kjaergaard HG, Smith RAJ, Murphy MP. Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells. *Biochemical journal* 2006; 400(1):199–208.
16. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Reviews Cancer* 2014; 14(11):709–721.
17. Terekhova NV, Tatarinov DA, Shaihutdinova ZM, Pashirova TN, Lyubina AP, Voloshina AD, Sapunova AS, Zakharova LYa, Mironov VF. Design and synthesis of amphiphilic 2-hydroxybenzylphosphonium salts with antimicrobial and antitumor dual action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2020; 30(13):127234. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127234.
18. Wang S, Zhao Y, Aguilar A, Bernard D, & Yang CY. Targeting the MDM2–p53 protein–protein interaction for new cancer therapy: progress and challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2017; 7(5):a026245. doi: 10.1101/cshperspect.a026245.
19. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2016; 6(5):a026070. doi: 10.1101/cshperspect.a026070.
20. World Health Organization Cancer. 2022. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. (Date of access 05.03.2023).
21. Xie M., Liu D., Yang Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open biology* 2020; 10(7):200004. doi: 10.1098/rsob.200004.
22. Zhu S., Wang X., Jiang H. Systematic reversal of drug resistance in cancer. *Targets* 2024; 2(3). — С. 250–286.

ANTITUMOR PROPERTIES AND MECHANISM OF ACTION OF ALKYL-2-HYDROXYBENZYL-DIPHENYLPHOSPHONIUM SALTS

A.P. LYUBINA, A.D. VOLOSHINA, S.K. AMERKHAANOVA, A.S. SAPUNOVA,
D.A. TATARINOV, V.F. MIRONOV

*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Kazan*

In this work alkyl-2-hydroxybenzyl-diphenylphosphonium salts with antimicrobial and antitumor dual action were investigated. The studied compounds exhibited a selective cytotoxic impact against cancer cell lines of promyelocytic leukemia, prostate carcinoma, and ovarian adenocarcinoma. The mechanism of the cytotoxic action of the tested compounds on M-HeLa cancer cells was demonstrated to be the DNA-damaging effect, which results in cell cycle arrest in the G1 phase and subsequent induction of apoptosis via the mitochondrial pathway. This is caused by the increased generation of active oxygen species and decreased mitochondrial membrane potential. It can be posited that the studied phosphonium salts may prove to be novel and efficacious anticancer agents with mitochondrial targeting capabilities.

Keywords: antitumor drugs, phosphonium salts, apoptosis, reactive oxygen species, DNA damage, cell cycle.

Address:

Lyubina A.P.
Junior researcher, A.E. Arbuzov Institute of Organic
and Physical Chemistry — OSP FRC KazSC RAS,
Kazan
E-mail: aplyubina@gmail.com

Для цитирования:

Любина А.П., Волошина А.Д., Амерханова С.К., Сапунова А.С., Татаринов Д.А., Миронов В.Ф. Противоопухолевые свойства и механизм действия алкил-2-гидроксibenзилдифенилфосфониевых солей. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2024; 20(4):68–75.

For citation:

Lyubina A.P., Voloshina A.D., Amerkhanova S.K., Sapunova A.S., Tatarinov D.A., Mironov V.F. Antitumor properties and mechanism of action of alkyl-2-hydroxybenzyl-diphenylphosphonium salts. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2024; 20(4):68–75 (in Russian).

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРАКТИКЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ

И.К. САВЕЛЬЕВА*, О.С. ЧЕМИСОВА, А.Б. МАЗРУХО, Г.Д. ХАРАБАДЖАХЯН, М.М. САГАКЯНЦ, В.А. РЫКОВА, О.А. ЦЫРУЛИНА, Д.И. КАМИНСКИЙ, Д.В. СОКОВ

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

В условиях значительного повышения потребления морепродуктов на территории Российской Федерации возрастает роль контроля их биологической безопасности. Отечественные нормативные документы предусматривают для этих целей возможность применения селективной питательной среды TCBS-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и зарубежных вариантов данной среды, зарегистрированных в РФ иностранными производителями. Общепринятой средой для определения гемолитической активности нехолерных вибрионов является среда Вагатцума (HiMedia, Индия). Во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора были разработаны среды аналогичного назначения с использованием отечественных компонентов: среда ПГСВ для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов и Набор СГВ для определения гемолитической активности вибрионов. Цель данного исследования — сравнительный анализ эффективности зарегистрированных в качестве изделий медицинского назначения питательных сред отечественного и зарубежного производства для диагностики пищевых токсикоинфекций, вызываемых патогенными для человека вибрионами. Для сравнения селективных свойств были отобраны следующие среды: TCBS-агар и ПГСВ (Россия), а также среда TCBS производства фирм HiMedia (Индия), Oхoid (Великобритания), Merck (Германия). Исследование свойств селективных сред проводили при использовании семи тест-штаммов вибрионов и двух тест-штаммов представителей сопутствующей микрофлоры. Для выявления гемолитической активности вибрионов в тесте Канагава сравнивали среду Набор СГВ со средой Вагатцума, используя пять штаммов *V. parahaemolyticus* с известными гемолитическими свойствами. Установлено, что все испытанные среды соответствуют требованиям нормативных документов на данные изделия. Селективным преимуществом обладали среды ПГСВ и TCBS (Oхoid и Merck). Выявлена возможность полноценной замены среды TCBS зарубежных производителей отечественными аналогами (ПГСВ и TCBS-агар). Среда ПГСВ дополнительно давала возможность идентифицировать парагемолитические вибрионы по признаку галофильности. Определение в тесте Канагава гемолитической активности вибрионов продемонстрировало, что отечественная среда Набор СГВ обладала большей эффективностью, чем среда Вагатцума.

Ключевые слова: питательные среды, парагемолитические вибрионы, *V. parahaemolyticus*, гемолитическая активность, выделение и идентификация вибрионов.

Введение

В последние годы в нашей стране наблюдается заметный рост потребления отдельных видов рыбы и большинства морепродуктов. По данным Росстата, употребление отдельных видов рыбы возросло с 17 до 23%, а мидий и креветок — более чем в три раза [11]. При этом связанные с пищевыми токсикоинфекциями

вibriозы продолжают занимать значительную часть инфекционных патологий. Так, в Астраханской области прирост острых кишечных инфекций, связанных с рыбой и рыбопродуктами, составил 14% [2, 10]. По данным экспертов Организации Объединённых Наций, положение с заболеваемостью, связанной с парагемолитическими вибрионами (ПГВ), за последние годы в мире не изменилось [24]. При этом в районах промысла рыбопродуктов и в аквакультурах возросла контаминация вибрионами вида *Vibrio vulnificus*, получивших преимущественное распространение на прибрежных территориях Тихого и Атлантического океанов. Инфицирование этим патогеном характеризуется септицемиями, коллагенозом, раневыми поражениями под воздействием цитотоксинов, фосфолипаз и эластаз, а также выявленного в последнее время MARTX-токсина [19, 20, 25]. Исследования вибрио-

© 2024 г. Савельева И.К., Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджян Г.Д., Сагакянц М.М., Рыкова В.А., Цырулина О.А., Каминский Д.И., Соков Д.В.

* Автор для переписки:

Савельева Ирина Константиновна
научный сотрудник лаборатории питательных сред, ФКУЗ
Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
E-mail: saveleva_ik@antiplague.ru

флоры объектов морского промысла Дальневосточного региона [1, 2] показали наличие различных видов патогенных вибрионов: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*. При этом наблюдалось преобладание отдельных видов в зависимости от изучаемого ареала (залив Петра Великого, залив Начанг и т.д.). Особый интерес представляют работы по выделению патогенных нехолерных вибрионов из аквакультур, которые продемонстрировали преобладание видов *V. anguillarum*, *V. furnissii*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* [4, 6, 17]. Наличие такого разнообразия вызывает сложности, возникающие при выделении и идентификации указанных представителей рода *Vibrio*.

Отечественная методология предусматривает использование для диагностики вибриозов как неселективных (пептонной воды, щелочного агара с солью), так и селективной питательной среды ТСBS, производимой ФБУН Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ) [7, 8, 16]. Также на территории Российской Федерации зарегистрировано около 10 вариантов ТСBS различных зарубежных производителей [3, 8, 10, 25, 26, 35]. При этом сравнительные исследования препаратов зарубежными специалистами указывают на значительные различия их эффективности в зависимости от производителя. Так, Y. Taylor et al. обнаружили, что среди различных вариантов ТСBS наиболее эффективна среда фирмы Eiken (Япония), показавшая результаты выше, чем среды BBL и Difco (США) [15, 34]. Сравнительное изучение ТСBS и других сред для выделения ПГВ обнаружило преимущество безсахарозного селективного агара ТТГ перед ТСBS по селективным свойствам, а также выявило возможность использования ТТГ для постановки оксидазного теста [21, 29]. В последние годы для диагностики патогенных вибриозов предложены хромогенные среды: Хайхромагар-вибрио (HiMedia, Индия) и ХРОМагар (CHROMagar, Франция), на которых колонии ПГВ и холерных вибрионов окрашиваются в разные цвета [35, 36]. Однако их цена многократно превышает стоимость среды ТСBS. Дополнительные возможности для выделения ПГВ были получены после разработки ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора среды «Набор реагентов для приготовления питательной среды для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов» (среда ПГСВ). Данная среда может быть использована как для выделения вибрионов, так и для их идентификации по признаку галофильности. Высокая эффективность новой среды была подтверждена в ходе регистрационных

испытаний [3, 18]. В 2019 году среда ПГСВ успешно прошла процедуру государственной регистрации.

Важной характеристикой при обнаружении *V. parahaemolyticus* является способность бактерий к продукции гемолизина, связанная с вирулентностью и эпидемической значимостью штамма. Дифференциация вирулентных и авирулентных штаммов ПГВ предусматривает использование теста Канагава, постановка которого осуществляется на среде Вагатцума лабораторного изготовления или зарегистрированной в Российской Федерации среде производства HiMedia (Индия). Во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт был запатентован состав и разработана технология получения набора питательных сред (Набор СГВ) для определения гемолитической активности ПГВ в тесте Канагава.

Таким образом, использование питательных сред (ПГСВ и Набор СГВ), разработанных во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, позволяет выделить и идентифицировать ПГВ, а затем дифференцировать их по признаку галофильности и гемолитической активности в тесте Канагава.

Настоящая работа посвящена выяснению возможности замены зарубежных питательных сред российскими аналогами. Цель исследования: сравнительный анализ используемых в лабораторной практике медицинских учреждений зарубежных сред (ТСBS и среда Вагатцума) с отечественными средами аналогичного назначения (ТСBS-агар, ПГСВ и Набор СГВ).

Материалы и методы

Для исследования селективных свойств были взяты следующие среды: экспериментальная серия питательной среды ПГСВ (РЗН 2019/8472), полученная на экспериментальной технологической линии в лаборатории питательных сред ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора по ТУ 20.59.52-001-01898316-2018; ТСBS-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, рег. удостоверение СЗН 2013/271); ТСBS-Agar (VibrioselectiveAgar, Merck, ФСЗ 2007/00435); ТСBS-Agar (Oxoid, ФСЗ 2011/09555); ТСBS-Agar (Selective, HiMedia, ФСЗ 2009/03709); щелочной агар с хлоридом натрия до 1,5%, приготовленный в соответствии с инструкцией по приготовлению среды. Контрольной средой являлся мясо-пептонный агар с 3% хлорида натрия, приготовленный по прописи МУК 4.2.3745-22, следующего состава: мясная вода — 1,0 л, пептон — 10,0 г/л, натрия хлорид — 30,0 г/л, агар-агар — 15,0 г/л, рН 8,0±0,2.

Для исследования селективных свойств сред использовали 9 тест-штаммов микроорганизмов: семь тест-штаммов вибрионов (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. parahaemolyticus* КМ 182, *V. parahaemolyticus* КМ 215, *V. parahaemolyticus* ATCC 13331, *V. parahaemolyticus* ATCC 17080, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. vulnificus* ATCC 27562) и два тест-штамма представителей сопутствующей микрофлоры (*E. coli* 18, *P. vulgaris* НХ 19 N 222), полученных из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Для проверки ингибирующих свойств сред готовили модельную смесь *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 – 10^4 КОЕ/мл + faeces (1/10).

Среды оценивали по основным биологическим показателям, предусмотренным действующими нормативными документами: чувствительность среды (максимальное разведение культуры, при котором на всех засеянных чашках обнаруживается рост), показатель прорастания микроорганизмов (отношение среднего числа выросших колоний на испытуемой среде к среднему числу колоний на контрольной среде, выраженное в процентах), идентифицирующие, ингибирующие и дифференцирующие свойства. Подготовку культур тест-штаммов проводили в соответствии с принятыми нормативами [9].

Гемолитическую активность ПГВ исследовали на среде «Набор реагентов для приготовления питательной среды для определения гемолитической активности парагемолитических вибрионов (Набор СГВ)» (ТУ 20.59.52-001-01898316-2022), проведённого на экспериментальной линии лаборатории питательных сред ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Средой сравнения являлась основа агара для теста Канагава (Wagatsuma Agar Base, HiMedia, ФСЗ 2009/03709), изготовленная в соответствии с инструкцией по приготовлению среды.

Для этих исследований использовали 5 штаммов парагемолитических вибрионов: два Канагава-

ва-положительных (*V. parahaemolyticus* 14704 и ATCC 13331), два Канагава-отрицательных (*V. parahaemolyticus* КМ 215 и ATCC 17802) и один штамм Канагава слабо положительный (*V. parahaemolyticus* ATCC 17080).

Статистическую обработку осуществляли с использованием программ «Microsoft Excel 2013» («Microsoft», США) и «Statistica 6.0» («StatSoft», США). Критической величиной уровня значимости считали 0,005.

Результаты и обсуждение

На первом этапе определяли чувствительность, скорость роста и показатель прорастания культур. На втором этапе — показатель ингибиции в отношении кишечной палочки и протей, на третьем этапе — возможность выделения возбудителя из модельных смесей (*V. parahaemolyticus* 10^4 КОЕ/мл + faeces в разведении 1/10) и их идентификации в тесте на галофильность. Результаты исследования на первом и втором этапах сравнивали с показателями, оговоренными в ТУ на среду ПГСВ [7, 8].

Нормативными документами по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами, предусмотрен посев исследуемого материала на селективные среды после накопления в щелочной пептонной воде с 1,5% хлорида натрия, либо прямой посев на селективную или неселективную агаровую среду [7, 8]. На селективных питательных средах ТСБС и ПГСВ при наличии в исследуемых образцах патогенных вибрионов по истечении 24 часов культивирования на поверхности агара вырастают голубоватые колонии сахарозонегативных вибрионов (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) или жёлтые колонии сахарозопозитивных вибрионов (*V. alginolyticus*). В таблице 1 представлены основные биологические показатели испытанных сред.

Таблица 1

Ростовые показатели питательных сред для выделения парагемолитических вибрионов

| Штаммы вибрионов | Показатели | Среды | | | | | | |
|--|----------------------------|-----------|-------------------------|---------------|---------------|-----------------|------------------------|-------------------------|
| | | ПГСВ | ТСБС ФБУН ГНЦ ПМБ | ТСБС Oxoid | ТСБС Merck | ТСБС HiMedia | Щел. агар 1,5% NaCl | Контроль МПА 3% NaCl |
| <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 | Чувствительность | 10^{-7} | 10^{-7} | 10^{-7} | 10^{-7} | 10^{-7} | 10^{-7} | 10^{-7} |
| | Показатель прорастания (%) | 79,2 | 65,3 | 91,3 | 86,7 | 80,0 | 81,3 | 100,0 |

| | | | | | | | | |
|--|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>V. alginolyticus</i> ATCC 177749 | Чувствительность | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ |
| | Показатель прорастания (%) | 111,9 | 114,3 | 120,7 | 103,0 | 110,4 | 98,2 | 100,0 |
| <i>V. vulnificus</i> ATCC 27562 | Чувствительность | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ |
| | Показатель прорастания (%) | 86,4 | 52,5 | 113,2 | 91,2 | 83,5 | 89,0 | 100,0 |

Из таблицы 1 видно, что как отечественные, так и зарубежные селективные среды характеризуются высокой чувствительностью (10⁻⁷) и показателями прорастания, значительно превышающими нормативный уровень (30%). На общем фоне несколько более низким показателем прорастания *V. parahaemolyticus* характеризовался ТСBS-агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ. Наилучшими ростовыми свойствами обладала среда фирмы Oxoid. Обращает на себя внимание несколько более низкий уровень ростовых свойств испытанных сред в отношении *V. vulnificus*, среднее количество колоний которого на среде не превышало 58 при показателях *V. parahaemolyticus* – 82 и *V. alginolyticus* – 87. Исследование культуральных свойств вибрионов не выявило преимуществ какой-либо из сред.

Установлено, что все испытанные среды обладают высокой подавляющей способностью в отношении кишечной палочки, обеспечивая полное подавление её роста. На всех средах отсутствовало роение *P. vulgaris*. При этом пророст колоний контаминанта максимально тормозился на среде ТСBS производства фирм Oxoid

и Merck. Результаты прямого посева модельной смеси указывают на возможность выделения ПГВ без предварительного обогащения на щелочной пептонной воде. Результаты представлены в таблице 2.

Представленные в таблицах 1 и 2 данные показывают соответствие среды ПГСВ указанным в ТУ параметрам – чувствительности среды 10⁻⁷, показателю прорастания не менее 30%. Указанная среда обеспечивает полное подавление роста тест-штамма кишечной палочки в разведении 10⁻², на ней наблюдается угнетение роста протей в разведении 10⁻⁴ и возможно выделение вибрионов из смеси с faeces при типичной морфологии выросших штаммов ПГВ за счёт разреженного роста контаминанта.

Следующим этапом работы явилось сравнение сред, предназначенных для определения гемолитической активности вибрионов (Набор СГВ и среда Вагатцума). Проведенные испытания в тесте Канагава показали высокую эффективность экспериментальной отечественной среды Набор СГВ на штаммах с различной гемолитической активностью. Результаты испытаний приведены в таблице 3.

Таблица 2

Селективные свойства питательных сред для выделения парагемолитических вибрионов

| Виды микроорганизмов | Показатель торможения при посеве тест-штаммов (разведение, возможность выделения возбудителя) | | | | | |
|--|---|-------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|
| | ПГСВ | ТСBS ФБУН ГНЦ ПМБ | ТСBS Oxoid | ТСBS Merck | ТСBS HiMedia | Щел. агар 1,5% NaCl |
| <i>E. coli</i> 18 | 10 ⁻² | 10 ⁻² | 10 ⁻² | 10 ⁻² | 10 ⁻² | 10 ⁻⁶ |
| <i>P. vulgaris</i> НХ 19 № 222 | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻³ | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁷ |
| Модельная смесь: 10 ⁴ <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 + faeces (1/10) | + | ± | + | + | ± | - |

Примечание: (+) – выделение возбудителя возможно; (±) – выделение возбудителя затруднено; (-) – выделение возбудителя невозможно

Таблица 3

Сравнительные результаты постановки теста Канагава при использовании среды Набор СГВ и среды Вагатцума

| Штамм / гемолитическая активность (КТ) | Показатели | | t-критерий Стьюдента* |
|--|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| | Среда Вагатцума | Набор СГВ | |
| | Размер зоны гемолиза (мм) | Размер зоны гемолиза (мм) | |
| <i>V. parahaemolyticus</i> 14704 (КТ+) | 3,3±0,24 | 4,4±0,17 | 3,74 |

| | | | |
|--|----------|----------|------|
| <i>V. parahaemolyticus</i> 13331 (КТ+) | 3,1±0,24 | 3,9±0,11 | 3,03 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> 17802 (КТ–) | 0 | 0 | - |
| <i>V. parahaemolyticus</i> 215 (КТ–) | 0 | 0 | - |
| <i>V. parahaemolyticus</i> 17080 (КТ±) | 2,1±0,14 | 2,6±0,13 | 2,62 |

Примечание: * – рассчитан для средних величин (n=12) зон гемолиза на среде СГВ и среде Вагатцума для каждого штамма. Критическое значение t-критерия Стьюдента при данном числе степеней свободы (f=22) равно 2,074 при уровне значимости $\rho=0,05$

Из сведений таблицы 3 следует, что отечественная питательная среда Набор СГВ обеспечивает чётко выражённую зону гемолиза, соответствующую паспортным данным штамма. Чёткий положительный результат демонстрировали штаммы, содержащие термостабильный токсин ТДН (диаметр зоны лизиса от 3,2±0,15 до 3,9±0,11 мм), нетоксигенные штаммы имели отрицательный результат (отсутствие гемолитической активности), низко токсигенный штамм демонстрировал слабо выраженную гемолитическую активность (диаметр зоны лизиса 2,6±0,13). Указанные величины превосходят показатели, полученные на зарубежной среде Вагатцума, и эти различия являются достоверными.

Заключение

В связи с дефицитом зарубежных препаратов и их компонентов на отечественном рынке, а также их высокой стоимостью показана принципиальная возможность замены сред зарубежных производителей отечественными аналогами. Сравнительные испытания сред ПГСВ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и ТСBS-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) с зарубежными средами идентичного назначения установили, что отечественные среды не уступают зарубежным образцам как по ростовым, так и по селективным свойствам. В отличие от зарубежных сред, отечественная среда ПГСВ дает возможность дифференцировать параземолитические вибрионы по признаку галофильности.

Среда для определения гемолитической активности Набор СГВ обеспечивает регистрацию наличия гемолизина как у Канагава-положительных штаммов, так и штаммов слабовирулентных, продуцирующих малое количество гемолизина. При этом на среде Набор СГВ вибрионы демонстрируют более четкую зону гемолиза, чем на среде Вагатцума.

Таким образом, исследованные среды отечественного производства пригодны для широкого использования в практическом здравоохранении и могут быть рекомендованы для диагностики вибриозов в лабора-

торной практике, в эпидемиологических исследованиях, а также для решения научных задач по изучению свойств параземолитических вибрионов.

Литература

1. Беленева И.А., Масленникова Э.Ф., Магарламов Т.Ю. Физиолого-биохимические свойства галофильных вибрионов *Vibrio parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, изолированных из гидробионтов залива Петра Великого Японского моря // Биология моря. – 2004. – Т. 30. – № 30. – С. 114–119.
2. Воронок В.М. Анализ групповой и вспышечной заболеваемости в Приморском крае // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2016. – № 3(66). – С. 78–84.
3. Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. (Режим доступа) URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (Дата обращения: 21.02.2020).
4. Куликовский А.В. Эмерджентные пищевые зоонозы. – М.: Крафт+, 2004. – 174 с.
5. Микробиология: Каталог 2004/2005 [МЕРСК]. – М.: ООО ВИТЭК-ФАРМ, 2005. – С. 171–172.
6. Миронова А.В., Меньшикова Е.А., Подосинникова Л.С. Влияние сред культивирования на экспрессию биологических свойств холерных вибрионов // Материалы пробл. комиссии. – Выпуск № 15. Ростов-на-Дону, 2002. – С. 65.
7. МУК 4.2.3886-23. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых параземолитическими и другими патогенными для человека вибрионами. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2023. – 39 с.
8. МУК 4.2.2046-06. Методы выявления и определения параземолитических вибрионов в рыбе, нерыбных объектах промысла, продуктах, вырабатываемых из них, воде поверхностных водоемов и других объектах: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2006. – 26 с.
9. МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. – М.: Феде-

- ральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. — 2008. — 67 с.
10. О профилактике пищевых отравлений и инфекционных болезней, передающихся с пищей. Роспотребнадзор. (Режим доступа) URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/page1.phpELEMENT_ID=18030 (Дата обращения 24.06.2021).
 11. Рыба, экспорт и импорт. Информация ФГБУ «Центр Агроаналитики». (Режим доступа) URL: specagro.ru (Дата обращения 30.06.2023).
 12. Рыковская О.А., Шалу О.А., Монахова Е.В., Смоликова Л.М., Чемисова О.С., Голенищева Е.Н., Санамянц Е.М., Гальцева Г.В., Алленов А.В., Мурначев Г.П., Хоменко Т.В. Разработка комплексного метода оценки вирулентности парагемолитических вибрионов // Клиническая лабораторная диагностика. — 2013. — № 2. — С. 38–41.
 13. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН 2.3.2.1078–01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. — М.: Минздрав России. — 2001. — 23 с.
 14. Скитович Г.С., Шадрова Н.Б., Прунтова О.В. *Vibrio parahaemolyticus*: распространение, выявление и методы идентификации // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 3(14). — С. 66–70.
 15. Среда типа TCBS (для выделения возбудителя холеры). (Режим доступа) URL: <https://artmedika.com/catalog/mikrobiologia/medium/product-7010.html> (Дата обращения 12.03.2020).
 16. Храмов М.В., Ажермачаева Н.И., Саяпина Л.В. и др. Изучение новой дифференциально-диагностической среды для выделения возбудителя холеры / Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы пробл. комиссии. Ростов-на-Дону, 2002. — Вып. 15. — С. 82.
 17. Хунхеева Ж.Ю., Миронова Л.В., Воронок В.М., Тарасенко Т.Т., Косенок Е.В., Алленов А.В., Хоменко Т.В., Солодкая Н.С., Балахонов С.В. Роль галофильных вибрионов в структуре острых кишечных инфекций на территории Приморского края / Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы пробл. комиссии. Ростов-на-Дону, 2017. — Вып. № 30. — С. 95–98.
 18. Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджахан Г.Д., Савельева И.К., Цырулина О.А., Сагакянц М.М., Рыкова В.А., Каминский Д.И., Соков Д.В., Ульрих Е.П. Оценка диагностической эффективности новой питательной среды для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов // Астраханский медицинский журнал. — 2021. — Т. 16. — № 2. — С. 62–70.
 19. Baker-Austin C., Oliver J.D. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen // Environ. Microbiol. — 2018. — Vol. 20. — No. 2. — P. 423–430.
 20. Dietrich J., Hammerl J.-A., John A., Kappenstein O., Loeffler C., Nockler K., Rosner B., Spielmeier A., Szabo I., Richter M.H. Impact of climate change on foodborne infections and intoxications // J. Health Monit. — 2023. — Vol. 3. — No. 8. — P. 78–92.
 21. Di Pinto A., Terio V., Novello L., Tantillo G. Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar TM *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus* // Food Control. — 2011. — Vol. 22. — No. 1. — P. 124–127.
 22. E&O Laboratories Ltd. TCBS Medium. Retrieved December 24, 2011. URL: www.eolabs.com/productdetail.html?id=PP0270.
 23. Elias N.A., Hassan M.S.A., Yusoff N.A.H., Tosin O.V., Harun N.A., Rahmah S., Hassan M. Potential and limitation of biocontrol methods against vibriosis: a review // Aquaculture Int. Springer Switzerland. — 2023. — Vol. 31. — No. 4. — P. 2355–2398.
 24. Fisheries and Aquaculture Report. Food and Agricultural Organization of the United Nations / World Health Organization (FAO/WHO). Report of the Joint Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption. — Rome, 2011.
 25. Guo R.H., Lim J.Y., Tra My D.N., Jo S.J., Park J.U., Rhee J.H. et al. *Vibrio vulnificus* RtxA1 toxin expression upon contact with host cell // Infect. Microbiol. — 2018. — Vol. 8. — Art. 70. doi: 10.3389/fcimb.2018.00070.
 26. Hardy Diagnostics (2010). TCBS Agar. Retrieved December 24, 2011. URL: www.catalog.hardydiagnostics.com/cd_prod/content/hugo/TCBSAgar.htm.
 27. Loo K.-Y., Law J.W.-F., Tan L.T.-H., Pusparajah P., Letchumanan V., Lee L.-H. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio* species // Aquaculture. — 2022. — Vol. 561. — Art. 738628. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738628
 28. Merck Millipore Combined Portfolio (2012). Application TCBS Agar (*Vibrio* Selective Agar). Retrieved March 18, 2013. URL: www.merckmillipore.my.
 29. Morris G.K., Merson M.H., Huq I., Kibrya A.K., Black R. Comparison of four plating media for isolating *Vibrio cholerae* // Journal of clinical microbiology. — 1979. — Vol. 9. — No. 1. — P. 79–83.
 30. Ngasotter S., Mukherjee S., Singh S.K., Bharti D., Haque R., Varshney S., Nanda C., Waikhom D., Devi M.S., Singh A.S. Prevalence, virulence, and antibiotic resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood and its environment: an updated review // Mediterr. J. Infect. Microb. Antimicrob. — 2021. — Vol. 11. — No. 1. doi: 10.4274/mjima.galenos.2021.2021.1.
 31. Noorian P., Hoque M.M., Espinoza-Vergara G., McDougald D. Environmental reservoirs of pathogenic *Vibrio* spp. and their role in diseases: the list keeps expanding *Vibrio* spp. // Adv. Exp. Med. Biol. — 2023. — Vol. 1404. — P. 99–126.
 32. Onohuean H., Agwu E., Nwodo U.U. A global perspective of *Vibrio* species and associated diseases: three-decade meta-synthesis of research advancement // Env. Health Inside. — 2022. — Vol. 16. — Art. 11786302221099406. doi: 10.1177/11786302221099406.

33. Sheikh H.I., Najjah M., Fadhina A., Laith A.A., Nor M.M., Jalal K.C.L., Kasan N.A. Temperature upshift mostly but not always enhances the growth of *Vibrio* species: a systematic review // *Marine Science*. — 2022. — Vol. 9. — Art. 959830. doi: 10.3389/fmars.2022.959830
34. Taylor J.A., Barrow G.I. A non-pathogenic vibrio for the routine quality control of TCBS cholera medium // *J. Clin. Pathol.* — 1981. — Vol. 34. — P. 208–212.
35. Uchiyama H. Distribution of *Vibrio* species isolated from aquatic environments with TCBS agar // *Environmental Health and Preventive Medicine*. — 2000. — Vol. 4. — P. 199–204.
36. Williams T.C., Froelich B.A., Oliver J.D. Characterization of *Vibrio* spp. on CBC, CHROM agar *Vibrio*, and TCBS, and proposed cross-plating method for isolation of *Vibrio vulnificus* from environmental samples. — Department of Biology, University of North Carolina at Charlotte POSTER ASM. 2012. URL: https://www.chromagar.com/wp-content/uploads/2021/12/VB_Williams_ASM_2012_P2552.pdf.
- ukazaniya. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora 2006: 26 (in Russian).
9. MUK 4.2.2316-08. Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred: Metodicheskiye ukazaniya. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora 2008: 67 (in Russian).
10. O profilaktike pishchevykh otravleniy i infektsionnykh bolezney, peredayushchikhsya s pishchey. Rospotrebnadzor. URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/page1.phpELEMENT_ID=18030 (Data of access: 24.06.2021) (in Russian).
11. Ryba, eksport i import. Informatsiya FGBU «Tsentr Agroanalitiki». URL: specagro.ru (Data of access: 30.06.2023) (in Russian).
12. Rykovskaya OA, Shalu OA, Monakhova YeV, Smolikova LM, Chemisova OS, Golenishcheva YeN, Sanamyants YeM, Gal'tseva GV, Allenov AV, Murnachev GP, Khomenko TV. Razrabotka kompleksnogo metoda otsenki virulentnosti paragemoliticheskikh vibriionov. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2013; 2:38–41 (in Russian).
13. Sanitarno-epidemiologicheskiye pravila i normativy. San PiN 2.3.2.1078–01. Gigiyenicheskiye trebovaniya bezopasnosti i pishchevoy tsennosti pishchevykh produktov. Moscow: Minzdrav Rossii 2001: 23 (in Russian).
14. Skitovich GS, Shadrova NB, Pruntova OV. *Vibrio parahaemolyticus*: rasprostraneniye, vyyavleniye i metody identifikatsii. *Veterinariya segodnya* 2015; 3(14):66–70 (in Russian).
15. Sreda tipa TCBS (dlya vydeleniya vzbuditelya kholery). URL: <https://artmedika.com/catalog/mikrobiologia/medium/product-7010.html> (Data of access: 12.03.2020).
16. Khramov M.V., Azhermachayeva N.I., Sayapina L.V. i dr. Izucheniye novoy differentsial'no-diagnosticskoy sredy dlya vydeleniya vzbuditelya kholery / Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriiony. *Materialy probl. komissii. Rostov-na-Donu*, 2002; 15: 82 (in Russian).
17. Khunkheyeva ZhYu, Mironova LV, Voronok VM, Tarasenko TT, Kosenok YeV, Allenov AV, Khomenko TV, Solodkaya NS, Balakhonov SV. Rol' galofil'nykh vibriionov v strukture ostryykh kishhechnykh infektsiy na territorii Primorskogo kraya. Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriiony. *Materialy probl. komissii. Rostov-na-Donu*, 2017; 30:95–98 (in Russian).
18. Chemisova OS, Mazrukho AB, Kharabadzhakhyan GD, Savel'yeva IK, Tsyulina OA, Sagakyants MM, Rykova VA, Kaminskiy DI, Sokov DV, Ul'rikh YeP. Otsenka diagnosticheskoy effektivnosti novoy pitatel'noy sredy dlya vydeleniya i pervichnoy identifikatsii paragemoliticheskikh vibriionov. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal* 2021; 16(2):62–70 (in Russian).
19. Baker-Austin C, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environ Microbiol* 2018; 20(2):423–430.
20. Dietrich J, Hammerl J-A, Johne A, Kappenstein O, Loeffler C, Nockler K, Rosner B, Spielmeyer A, Szabo I, Richter

References

1. Beleneva IA, Maslennikova EF, Magarlamov TYu. Fiziologo-biokhimicheskiye svoystva galofil'nykh vibriionov *Vibrio parahaemolyticus* i *V. alginolyticus*, izolirovannykh iz gidrobiontov zaliva Petra Velikogo Yaponskogo morya. *Biologiya morya* 2004; 30(30):114–119 (in Russian).
2. Voronok VM. Analiz gruppovoy i vspyshechnoy zabol-evayemosti v Primorskom kraye. *Zdorov'ye. Meditsinskaya ekologiya. Nauka* 2016; 3(66):78–84 (in Russian).
3. Gosudarstvennyy reyestr meditsinskikh izdeliy i organizatsiy (individual'nykh predprinimateley), osushchestvlyayushchikh proizvodstvo i izgotovleniye meditsinskikh izdeliy. Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zdravookhraneniya. URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (Data of access: 21.02.2020) (in Russian).
4. Kulikovskiy AV. Emerdzhentnyye pishchevyye zoonozy. Moscow: Kraft+, 2004: 174 (in Russian).
5. Mikrobiologiya: Katalog 2004/2005 [MERCK]. Moscow: OOO VITEK-FARM, 2005: 171–172 (in Russian).
6. Mironova AV, Men'shikova YeA, Podosinnikova LS. Vliyaniye sred kul'tivirovaniya na ekspressiyu biologicheskikh svoystv kholernykh vibriionov. *Materialy probl. komissii. Vypusk № 15. Rostov-na-Donu*, 2002: 65 (in Russian).
7. MUK 4.2.3886-23. Laboratornaya diagnostika zabolevaniy, vyzyvayemykh paragemoliticheskimi i drugimi patogennymi dlya cheloveka vibriionami. Metodicheskiye ukazaniya. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora 2023: 39 (in Russian).
8. MUK 4.2.2046-06. Metody vyyavleniya i opredeleniya paragemoliticheskikh vibriionov v rybe, nerybnykh ob'yektakh promysla, produktakh, vyrabatyvayemykh iz nikh, vode poverkhnostnykh vodoyemov i drugikh ob'yektakh: Metodicheskiye

- MH. Impact of climate change on foodborne infections and intoxications. *J Health Monit* 2023; 3(8):78–92.
21. Di Pinto A, Terio V, Novello L, Tantillo G. Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar™ *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control* 2011; 22(1):124–127.
22. E&O Laboratories Ltd. TCBS Medium. Retrieved December 24, 2011. URL: www.eolabs.com/productdetail.html?id=PP0270.
23. Elias NA, Hassan MSA, Yusoff NAH, Tosin OV, Harun NA, Rahmah S, Hassan M. Potential and limitation of bio-control methods against vibriosis: a review. *Aquaculture Int Springer Switzerland* 2023; 31(4):2355–2398.
24. Fisheries and Aquaculture Report. Food and Agricultural Organization of the United Nations. World Health Organization (FAO/WHO). Report of the Joint Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption. Rome, 2011.
25. Guo RH, Lim JY, Tra My DN, Jo SJ, Park JU, Rhee JH et al. *Vibrio vulnificus* RtxA1 toxin expression upon contact with host cell. *Infect Microbiol* 2018; 8:70. doi: 10.3389/fcimb.2018.00070.
26. Hardy Diagnostics (2010). TCBS Agar. Retrieved December 24, 2011. URL: www.catalog.hardydiagnostics.com/cd_prod/content/hugo/TCBSAgar.htm.
27. Loo K-Y, Law JW-F, Tan LT-H, Pusparajah P, Letchumanan V, Lee L-H. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio* species. *Aquaculture* 2022; 561:738628. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738628
28. Merck Millipore Combined Portfolio (2012). Application TCBS Agar (*Vibrio* Selective Agar). Retrieved March 18, 2013. URL: www.merckmillipore.my.
29. Morris GK, Merson MH, Huq I, Kibrya AK, Black R. Comparison of four plating media for isolating *Vibrio cholerae*. *Journal of clinical microbiology* 1979; 9(1):79–83.
30. Ngasotter S, Mukherjee S, Singh SK, Bharti D, Haque R, Varshney S, Nanda C, Waikhom D, Devi MS, Singh AS. Prevalence, virulence, and antibiotic resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood and its environment: an updated review. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob* 2021; 11(1). doi: 10.4274/mjima.galenos.2021.2021.1.
31. Noorian P, Hoque MM, Espinoza-Vergara G, McDougald D. Environmental reservoirs of pathogenic *Vibrio* spp. and their role in diseases: the list keeps expanding *Vibrio* spp. *Adv Exp Med Biol* 2023; 1404:99–126.
32. Onohuean H, Agwu E, Nwodo UU. A global perspective of *Vibrio* species and associated diseases: three-decade meta-synthesis of research advancement. *Env Health Inside* 2022; 16:11786302221099406. doi: 10.1177/11786302221099406.
33. Sheikh HI, Najjah M, Fadhilina A, Laith AA, Nor MM, Jalal KCL, Kasan NA. Temperature upshift mostly but not always enhances the growth of *Vibrio* species: a systematic review. *Marine Science* 2022; 9:959830. doi: 10.3389/fmars.2022.959830
34. Taylor JA, Barrow GI. A non-pathogenic vibrio for the routine quality control of TCBS cholera medium. *J Clin Pathol* 1981; 34:208–212.
35. Uchiyama H. Distribution of *Vibrio* species isolated from aquatic environments with TCBS agar. *Environmental Health and Preventive Medicine* 2000; 4:199–204.
36. Williams TC, Froelich BA, Oliver JD. Characterization of *Vibrio* spp. on CBC, CHROM agar *Vibrio*, and TCBS, and proposed cross-plating method for isolation of *Vibrio vulnificus* from environmental samples. Department of Biology, University of North Carolina at Charlotte POSTER ASM. 2012. URL: https://www.chromagar.com/wp-content/uploads/2021/12/VB_Williams_ASM_2012_P2552.pdf.

ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF NUTRIENT MEDIUM USED IN PRACTICE FOR THE ISOLATION, IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF PARAHAEMOLYTIC VIBRIOS

I.K. SAVELYEVA, O.S. CHEMISOVA, A.B. MAZRUKHO, G.D. KHARABAJAKHYAN, M.M. SAGAKYANTS, V.A. RYKOVA, O.A. TSIRULINA, D.I. KAMINSKY, D.V. SOKOV

Rostov-on-Don Anti-plague Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Rostov-on-Don

In the context of a significant increase in seafood consumption on the territory of the Russian Federation, the role of monitoring of their biological safety is rising. For these purposes, local regulatory documents provide the possibility of using the selective nutrient medium TCBS-agar (FBIS GSC PMB, Russia) along with foreign versions of this medium registered in the Russian Federation by foreign manufacturers. Vagatzuma medium (HiMedia, India) is a generally accepted medium to determine the hemolytic activity of non-choleric vibrios. Mediums of a similar purpose were developed at the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, with the use of domestic components: a PGV medium for the isolation and primary identification of parahaemolytic vibrios and a Set of SCV

medium to determine the hemolytic activity of vibrios. The purpose of the study is a comparative analysis of the effectiveness of nutrient media of local and foreign production registered as medical devices for the diagnosis of food toxicoinfections caused by pathogenic to humans vibrios. To compare the selective properties, the following media were selected: TCBS-agar and PGS B (Russia), as well as TCBS medium manufactured by HiMedia (India), Oxoid (Great Britain), Merck (Germany). The properties of selective media were studied using seven vibrio test strains and two test strains of representatives of the accompanying microflora. To identify the hemolytic activity of vibrios in the Kanagawa test, a set of SGV media was compared with a Wagatsuma medium with the use of five strains of *V. parahaemolyticus* with known hemolytic properties. It has been established that all tested media satisfied the requirements of regulatory documents for these products. The media of HCV and TCBS (Oxoid and Merck) possessed the selective advantage. There was shown the possibility of total replacement of the TCBS medium of foreign manufacturers on the local analogues (PGS and TCBS-agar). The HCV medium additionally made it possible to identify parahaemolytic vibrios on the halophilicity sign. The determination of the hemolytic activity of vibrios in the Kanagawa test showed that the local medium Set of SGV was more effective than the Wagatsuma medium.

Keywords: nutrient medium, parahaemolytic vibrios, *V. parahaemolyticus*, hemolytic activity, isolation and identification of vibrios.

Address:

Savelyeva I.K.

researcher of the laboratory of nutrient media, Rostov-on-Don

Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor,

E-mail: saveleva_ik@antiplague.ru

Для цитирования:

Савельева И.К., Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджаян Г.Д., Сагакянц М.М., Рыкова В.А., Цырулина О.А., Каминский Д.И., Соков Д.В. Анализ эффективности используемых в практике питательных сред для выделения, идентификации и дифференциации парагемолитических вибрионов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):76–84.

For citation:

Savelyeva I.K., Chemisova O.S., Mazrukho A.B., Kharabajakhyan G.D., Sagakyants M.M., Rykova V.A., Tsiurlina O.A., Kaminsky D.I., Sokov D.V. Analysis of the effectiveness of nutrient medium used in practice for the isolation, identification and differentiation of parahaemolytic vibrio. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4):76–84 (in Russian).

ОПТИМИЗАЦИЯ АНОДА МИКРОБНОГО БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА НА ОСНОВЕ КАРБОНИЗИРОВАННОЙ ТКАНИ

Е.Д. СИЗИКОВА¹, М.В. ВИШНЕВСКАЯ², П.М. ГОТОВЦЕВ^{2,3*},
В.Г. СУЧКОВ², В.А. ЕРШОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ²

¹ Московский политехнический университет,

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)

В настоящее время человечество остро нуждается в надежных и эффективных технологиях, которые способны решить проблемы загрязнения водных резервов и дефицита энергоресурсов. Решением данной проблемы может стать активное использование биотопливных элементов. В данной работе представлен микробный биотопливный элемент на основе электродов из различных видов графитированной ткани. На аноды нанесена смесь из *Gluconobacter oxydans*, ПЕГДЕ и ПЕДОТ:ПСС. В качестве электролита выступают искусственные сточные воды. Была измерена электрическая мощность полученных ячеек. В ходе измерений установлено, что при использовании углеродной ткани с более плотным плетением удельная мощность значительно возрастает.

Ключевые слова: безмембранный микробный биотопливный элемент, *Gluconobacter oxydans*, сточные воды.

Введение

Очистка сточных вод требует разработки инновационных методов удаления загрязняющих веществ, поскольку уже существующие методы не достаточно эффективны [6] и не соответствуют современным требованиям [11]. Поверхностные и хозяйственно-бытовые сточные воды, образующиеся в результате человеческой деятельности — сельского хозяйства, работы промышленности, а также бытового использования, содержат высокие концентрации органических веществ [13]. Очистка и повторное использование этих вод сегодня является одной из важнейших задач, которые необходимо решать для развития городских и сельских поселений.

В последние годы особое внимание уделяется применению микробных биотопливных элементов (МБТЭ) как перспективной технологии, способной не только очищать сточные воды, но и одновременно

генерировать электричество [3]. МБТЭ представляют собой устройства, которые преобразуют химическую энергию в электрическую благодаря метаболической активности различных [8, 17] микроорганизмов. Использование МБТЭ для очистки сточных вод сочетает в себе две цели: улучшение качества воды и получение электрической энергии, что делает данный подход экологически и экономически эффективным. В дальнейшем такие ячейки можно использовать не только для очистки поверхностных сточных вод, но и для работы различных микроустройств [2, 12], датчиков мониторинга состояния окружающей среды — биосенсоров [1, 5], в качестве замены традиционных локальных источников энергии [7]. К тому же такие биосенсоры можно эффективно перекалибровывать для различных типов сточных вод, адаптируя под изменения условий [10]. Также показано, что МБТЭ с анодом с иммобилизованными клетками *Gluconobacter oxydans* обладают большим временем работы [15].

Основными проблемами, ограничивающими активное использование МБТЭ, являются высокая стоимость мембраны и материалов электродов. На сегодня показана возможность создания эффективных МБТЭ, работающих без мембраны и медиаторов для транспорта заряда с клеток микроорганизмов на электрод [13, 14]. Одним из недорогих материалов для электродов с доказанной эффективностью является графитированная ткань [14].

© 2024 г. Сизикова Е.Д., Вишневская М.В., Готовцев П.М., Сучков В.Г., Ершова В.А., Василев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Готовцев Павел Михайлович

кандидат технических наук, заместитель начальника отдела биотехнологий и биоэнергетики Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт»

E-mail: gotovtsevpm@gmail.com

Цель настоящей работы состоит в рассмотрении различных рыночно доступных карбонизированных тканей в качестве электродов для биотопливных элементов.

Материалы и методы

Микробная биотопливная ячейка представляет собой систему из пластиковой камеры с катодным и анодным отсеками, электролита и двух электродов, прикрепленных к штативу. Объем ячейки составляет 150 мл, объем электролита в ячейке — 140 мл.

Электроды представляли собой участки углеродной ткани 3×10 см, края которой были обклеены полиуретановой лентой толщиной в 0,1 мм во избежание распада нитей ткани. Характеристики материалов электродов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика образцов углеродных тканей

| Образец | Материал | Плотность, г/м ² | Плетение |
|---------|--------------------------------------|-----------------------------|----------|
| УТ 1 | 60% углеволокно 40% стекловолокно | 300 | полотно |
| УТ 2 | карбон | 240 | жаккард |
| УТ 3 | карбон | 200 | полотно |
| УТ 4 | карбон | 600 | саржа |
| УТ 5 | карбон | 400 | саржа |

На анод нанесена смесь из бактерий *Glucanobacter oxydans*, полимеров ПЕДОТ:ПСС и ПЕГДЕ. Для этого была культивирована и собрана биомасса клеток *Glucanobacter oxydans* по методу, изложенному в работе [16]. Далее 200 мкл полученной биомассы смешивалась с 50 мкл ПЕДОТ:ПСС и ПЕГДЕ. Таким образом, было достигнуто соотношение компонентов в смеси 4:1:1. Затем смесь порционно нанесли на электрод. На финальном этапе приготовления смесь была высушена при комнатной температуре.

В качестве электролита использовались искусственные сточные воды. Их состав включал в себя 500 мг/л глюкозы, 95,5 мг/л NH₄Cl, 28,15 мг/л мочевины, 22,6 мг/л KН₂РО₄, 12,6 мг/л FeSO₄×7Н₂О, 309 мг/л NaНСО₃ и 17,5 мг/л дрожжевого экстракта [9].

Мощность биотопливного элемента определялась с использованием метода линейной вольтамперметрии. Измерение вольтамперной характеристики (ВАХ) осуществлялось с помощью потенциостата/гальваностата AUTOLAB PGSTAT302N по двухэлектродной схеме. Скорость сканирования была равна: 10 мВ/с, каждая ВАХ снималась четыре раза.

Результаты и обсуждение

В таблице 2 представлены результаты экспериментов со всеми пятью образцами анодов. Для определения электрической мощности проводилась потенциостатическая вольтамперметрия с линейной разверткой, результаты которой представлены на рисунке 1. Удельная емкость ячеек определялась с использованием циклической потенциостатической вольтамперметрии, которая показана на рисунке 2.

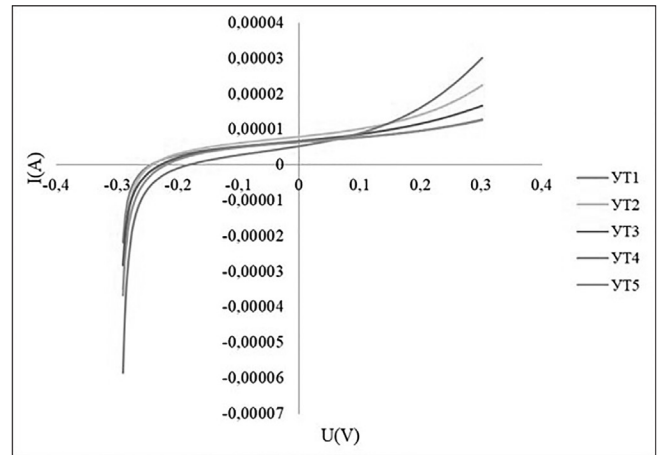


Рис. 1. Потенциостатические вольтамперметрии с линейной разверткой ячеек УТ1–УТ5

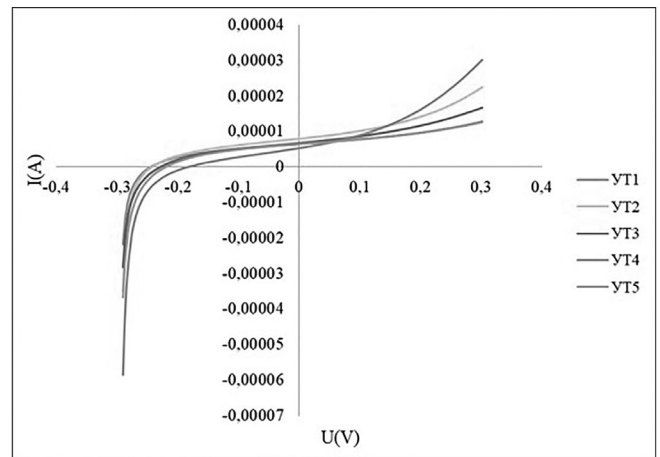


Рис. 2. Циклические потенциостатические вольтамперметрии ячеек УТ1–УТ5

Удельная электрическая мощность ячеек с разными электродами составила от 94 до 216 мВт/м². Указанные значения являются достаточно высокими в сравнении с данными литературы [4, 15]. То же самое можно сказать и про емкости ячеек, которые, с учетом размеров электродов и объема электролита, являются высокими для подобного типа МБТЭ. Причиной таких высоких показателей служит относительно низкая гидрофобность выбранных углеродных тканей по сравнению с

аналогами, присутствующими на рынке. Такое свойство поверхностей тканей способствует как эффективному закреплению клеток, так и более полному взаимодействию иммобилизованных клеток бактерий с электролитом. Для того чтобы оценить стабильность воспроизведения

достигнутых показателей, из пяти образцов углеродной ткани для дальнейшего исследования были отобраны три (УТ2, УТ4, УТ5), при использовании которых у микробной биотопливной ячейки были самые высокие показатели мощности.

Таблица 2

Данные по всем образцам углеродных тканей

| Ткань | Масса клеток | S катода, см ² | S анода, см ² | S раб. пов., м ² | Р уд max (мВт/м ²) | с уд max (мФ/м ²) |
|-------|--------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| УТ1 | 0,2075 | 31,02 | 30 | 0,000228 | 131,0877 | 71,2597 |
| УТ2 | 0,2160 | | | 0,000208 | 196,0548 | 79,3343 |
| УТ3 | 0,2101 | | | 0,000304 | 94,6003 | 45,0869 |
| УТ4 | 0,2169 | | | 0,000221 | 168,5936 | 66,3781 |
| УТ5 | 0,2013 | | | 0,000255 | 216,5765 | 104,4011 |

Потенциостатические вольтамперометрии с линейной разверткой ячеек УТ2, УТ4, УТ5 представлена на рисунке 3. Видно, что для данных образцов характеристика аналогична представленной в первом эксперименте. Также воспроизводится и циклическая потенциостатическая вольтамперометрия, которая показана на рисунке 4. В таблице 3 представлены значения электрической мощности для трех ячеек с анодами УТ2, УТ4, УТ5. Видно, что для всех материалов значения удельной электрической мощности

превышают 168 мВт/м². Наибольшей стабильностью в выработке мощности во всех экспериментах отличался БТЭ с анодом на основе ткани УТ5. Также хорошими показателями отличался электрод с тканью УТ4. Оба этих материала имеют одинаковый тип плетения и более высокую плотность, по сравнению с другими материалами. Вероятно, оба этих фактора обеспечивают большую доступную поверхность для иммобилизации бактериальных клеток и диффузии к ним субстрата из электролита.

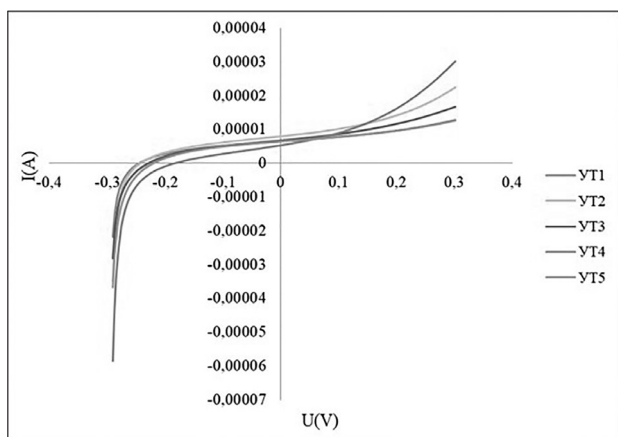


Рис. 3. Потенциостатические вольтамперометрии с линейной разверткой ячеек УТ2, УТ4, УТ5

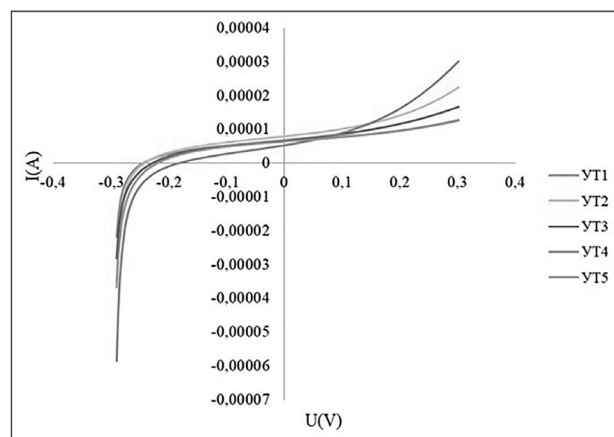


Рис. 4. Циклические потенциостатические вольтамперометрии ячеек УТ2, УТ4, УТ5

Таблица 3

Зависимость электрической удельной мощности от типа углеродной ткани

| Ткань | Максимальная удельная мощность ячейки, мВт/м ² | | | |
|-------|---|--------------------|--------------------|-----------------------|
| | Первый эксперимент | Второй эксперимент | Третий эксперимент | Четвертый эксперимент |
| УТ2 | 196,0548 | 312,0569 | 171,9581 | 303,2082 |
| УТ4 | 168,5936 | 188,9546 | 168,1294 | 206,5217 |
| УТ5 | 216,5765 | 285,7675 | 190,6581 | 315,1108 |

Заключение

В настоящей работе были продемонстрированы микробные биотопливные ячейки, которые в дальнейшем могут помочь человечеству при очистке поверхностных сточных вод, а также могут использоваться для работы автономных датчиков анализа состояния окружающей среды. Также удалось выяснить, что использование в качестве электродов углеродных тканей с наибольшей плотностью повышает значение электрической мощности ячейки. Максимальное значение мощности, которого удалось достичь в ходе экспериментов, составило 0,3151 Вт/м² и было получено при использовании углеродной ткани 4. Полученные результаты говорят о перспективности использования плотных углеродных тканей в качестве электродов для микробных биотопливных элементов.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Alferov S.V., Arlyapov V.A., Alferov V.A. & Reshetilov A.N. Express analysis of biochemical oxygen demand // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2018. — Vol. 54. — No. 6. — P. 689–694.
2. Chakraborty I., Olsson R.T., Andersson R.L., Pandey A. Glucose-based biofuel cells and their applications in medical implants: A review // Heliyon. — 2024. — Vol. 10(13). — e33615. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e33615.
3. Garbini G.L., Barra Caracciolo A., Grenni P. Electroactive bacteria in natural ecosystems and their applications in microbial fuel cells for bioremediation: A review // Microorganisms. — 2023. — Vol. 11. — No. 5. — Art. 1255. doi: 10.3390/microorganisms11051255.
4. Gil G.C., Chang I.S., Kim B.H., Kim M., Jang J.K., Park H.S., Kim H.J. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell // Biosensors and Bioelectronics. — 2003. — Vol. 18. — No. 4. — P. 327–334.
5. Gotovtsev P.M., Dyakov A.V. Biotechnology and internet of things for green smart city application. — 2016. — IEEE 3rd World Forum on Internet of Things (WF-IoT) Conference proceedings. Reston, USA.
6. Kehrein P., van Loosdrecht M., Osseweijer P., Garfi M., Dewulf J., Posada J. A critical review of resource recovery from municipal wastewater treatment plants: market supply potentials, technologies and bottlenecks // Environ. Sci.: Water Res. Technol. — 2020. — Vol. 6. — P. 877–910.
7. Perchikov R., Cheliukanov M., Plekhanova Y., Tarasov S., Kharkova A., Butusov D., Arlyapov V., Nakamura H., Reshetilov A. Microbial biofilms: Features of formation and

potential for use in bioelectrochemical devices // Biosensors (Basel). — 2024. — Vol. 14. — No. 6. — Art. 302. doi: 10.3390/bios14060302.

8. Rahimnejad M., Adhami A., Darvari S., Zirepour A., Oh Sang-Eun. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review // Alexandria Engineering Journal. — 2015. — Vol. 88(3). http://dx.doi.org/10.1016/j.aej.2015.03.031.
9. Salgueiro J., Pérez L., Maceiras R., Sánchez A., Cancela A. Semicontinuous culture of *Chlorella vulgaris* microalgae for wastewater treatment // International Journal of Environmental Research. — 2018. — Vol. 12. — No. 6. — P. 765–772.
10. Salvian A., Farkas D., Ramirez-Moreno M. et al. Resilience of anodic biofilm in microbial fuel cell biosensor for BOD monitoring of urban wastewater // npj Clean Water. — 2024. — Vol. 7. — Art. 53. doi: 10.1038/s41545-024-00350-5.
11. Sathya K., Nagarajan K., Carlin Geor Malar G., Rajalakshmi S. & Raja Lakshmi P. A comprehensive review on comparison among effluent treatment methods and modern methods of treatment of industrial wastewater effluent from different sources // Appl. Water Sci. — 2022. — Vol. 12. — No. 4. — Art. 70. doi: 10.1007/s13201-022-01594-7.
12. Sharma A., Singh G., Arya S.K. Biofuel cell nanodevices // International Journal of Hydrogen Energy. — 2021. — Vol. 46. — Issue 4. — P. 3270–3288.
13. Shon H.K., Vigneswaran S. & Snyder S.A. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: Constituents, effects, and treatment // Journal Critical Reviews in Environmental Science and Technology. — 2007. — Vol. 36. — P. 327–374.
14. Vishnevskaya M., Gazizova D., Victorenko A., Konova I. Membraneless microbial biofuel cell for municipal waste water treatment // IOP Conference Series Earth and Environmental Science. — 2018. — Vol. 337. — Art. 012002. doi: 10.1088/1755-1315/337/1/012002.
15. Vishnevskaya M.V., Parunova Yu.M., Reshetilov A.N., Plekhanova Yu.V., Tarasov S.E. and Vasilov R.G. On the stable operation of a membraneless microbial fuel cell for more than one hundred days // Nanobiotechnology Reports. — 2023. — Vol. 18. — No. 1. — P. 28–32.
16. Vostiar I., Ferapontova E.E., Gorton L. Electrical «wiring» of viable *Gluconobacter oxydans* cells with a flexible osmium-redox polyelectrolyte // Electrochemistry Communications. — 2004. — Vol. 6. — No. 7. — P. 621–626.
17. Zhdanova G.O., Dukhnov S.S. and Stom D.I. Single-cell biofuel element of simple construction from sanitary parts and testing of its work // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. — 2018. — Vol. 451(1). — Art. 012230. doi: 10.1088/1757-899X/451/1/012230.

References

1. Alferov SV, Arlyapov VA, Alferov VA & Reshetilov AN. Express analysis of biochemical oxygen demand. Applied Biochemistry and Microbiology 2018; 54(6):689–694.

- Chakraborty I, Olsson RT, Andersson RL, Pandey A. Glucose-based biofuel cells and their applications in medical implants: A review. *Heliyon* 2024; 10(13):e33615. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e33615.
- Garbini GL, Barra Caracciolo A, Grenni P. Electroactive bacteria in natural ecosystems and their applications in microbial fuel cells for bioremediation: A review. *Microorganisms* 2023; 11(5):1255. doi: 10.3390/microorganisms11051255.
- Gil GC, Chang IS, Kim BH, Kim M, Jang JK, Park HS, Kim HJ. Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosensors and Bioelectronics* 2003; 18(4):327–334.
- Gotovtsev P.M., Dyakov A.V. Biotechnology and internet of things for green smart city application 2016; IEEE 3rd World Forum on Internet of Things (WF-IoT) Conference proceedings. Reston, USA.
- Kehrein P, van Loosdrecht M, Osseweijer P, Garfi M, Dewulf J, Posada J. A critical review of resource recovery from municipal wastewater treatment plants: market supply potentials, technologies and bottlenecks. *Environ Sci: Water Res. Technol* 2020; 6:877–910.
- Perchikov R, Cheliukanov M, Plekhanova Y, Tarasov S, Kharkova A, Butusov D, Arlyapov V, Nakamura H, Reshetilov A. Microbial biofilms: Features of formation and potential for use in bioelectrochemical devices. *Biosensors (Basel)* 2024; 14(6):302. doi: 10.3390/bios14060302.
- Rahimnejad M, Adhami A, Darvari S, Zirepour A, Oh Sang-Eun. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. *Alexandria Engineering Journal* 2015; 88(3). <http://dx.doi.org/10.1016/j.aej.2015.03.031>.
- Salgueiro J, Pérez L, Maceiras R, Sánchez A, Cancela A. Semicontinuous culture of *Chlorella vulgaris* microalgae for wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research* 2018; 12(6):765–772.
- Salvian A, Farkas D, Ramirez-Moreno M et al. Resilience of anodic biofilm in microbial fuel cell biosensor for BOD monitoring of urban wastewater. *npj Clean Water* 2024; 7:53. doi: 10.1038/s41545-024-00350-5.
- Sathya K, Nagarajan K, Carlin Geor Malar G, Rajalakshmi S & Raja Lakshmi P. A comprehensive review on comparison among effluent treatment methods and modern methods of treatment of industrial wastewater effluent from different sources. *Appl Water Sci* 2022; 12(4):70. doi: 10.1007/s13201-022-01594-7.
- Sharma A, Singh G, Arya SK. Biofuel cell nanodevices. *International Journal of Hydrogen Energy* 2021; 46(4):3270–3288.
- Shon HK, Vigneswaran S & Snyder SA. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: Constituents, effects, and treatment. *Journal Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2007; 36:327–374.
- Vishnevskaya M, Gazizova D, Victorenko A, Konova I. Membraneless microbial biofuel cell for municipal waste water treatment. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science* 2018; 337:012002. doi: 10.1088/1755-1315/337/1/012002.
- Vishnevskaya MV, Parunova YuM, Reshetilov AN, Plekhanova YuV, Tarasov SE and Vasilov RG. On the stable operation of a membraneless microbial fuel cell for more than one hundred days. *Nanobiotechnology Reports* 2023; 18(1):28–32.
- Vostiar I, Ferapontova EE, Gorton L. Electrical «wiring» of viable *Gluconobacter oxydans* cells with a flexible osmium-redox polyelectrolyte. *Electrochemistry Communications* 2004; 6(7):621–626.
- Zhdanova GO, Dukhnov SS and Stom DI. Single-cell biofuel element of simple construction from sanitary parts and testing of its work. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 2018; 451(1):012230. doi: 10.1088/1757-899X/451/1/012230.

OPTIMIZATION OF THE ANODE OF A MICROBIAL BIOFUEL CELL BASED ON CARBONIZED FABRIC

E.D. SIZIKOVA¹, M.V. VISHNEVSKAYA², P.M. GOTOVTSEV^{2,3},
V.G. SUCHKOV², V.A. ERSHOVA¹, R.G. VASILOV²

¹ *Moscow Polytechnic University,*

² *National research centre «Kurchatov institute»,*

³ *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)*

Currently, humanity is in dire need of reliable and efficient technologies that can solve the problems of water pollution and energy shortages. The active use of biofuel cells can be a solution to this problem. This paper presents a microbial biofuel cell based on electrodes made of various types of graphitized fabric. A mixture of *Gluconobacter oxydans*, PEGDE and PEDOT:PSS is applied to the anodes. Artificial wastewater is used as an electrolyte. The electric power of the resulting cells was measured. During the measurements it was found that when using carbon fabric with a denser weave, the specific power increases significantly.

Keywords: membrane-free microbial biofuel element, *Gluconobacter oxydans*, wastewater.

Address:

Gotovtsev P.M., Ph.D. of Technical Sciences
deputy head of the department of biotechnology
and bioenergy of the Kurchatov Complex
NBICS-nature-like technologies
of the National research centre «Kurchatov institute»
E-mail: gotovtsevpm@gmail.com

Для цитирования:

Сизикова Е.Д., Вишневецкая М.В., Готовцев П.М., Сучков В.Г., Ершова В.А., Василов Р.Г. Оптимизация анода микробного биотопливного элемента на основе карбонизированной ткани. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):85–90.

For citation:

Sizikova E.D., Vishnevskaya M.V., Gotovtsev P.M., Suchkov V.G., Ershova V.A., Vasilov R.G. Optimization of the anode of a microbial biofuel cell based on carbonized fabric. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4):85–90 (in Russian).

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ТЕЛЛУРА НА МИКРООРГАНИЗМЫ. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

А.В. ЕВТЕЕВ*, С.О. ВОДОПЬЯНОВ

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

Теллур (Te) — это тяжелый элемент с физическими свойствами и блеском, свойственными металлам, и химическими свойствами неметалла, сходными со свойствами серы и мышьяка. Предполагают, что токсичность теллура связана с образованием активных форм кислорода, которые вызывают повреждение ключевых компонентов клетки или с его способностью заменять серу с неблагоприятными последствиями для метаболизма клеток. Сравнительная устойчивость некоторых патогенных микроорганизмов к теллуру привела к его использованию в составе питательных сред в качестве селективного фактора, в том числе и при выделении холерного вибриона. Гены, связанные с устойчивостью к теллуру, обнаружены у многих бактерий. Имеются данные о существовании у одного штамма *Vibrio cholerae* гена *TehAVc* (VC2323), детерминирующего продукцию протеина, гомологичного белку *TehA*, опосредующему резистентность к теллуру у *Escherichia coli*. Обсуждены перспективы дальнейшего использования соединений теллура в качестве селективного фактора.

Ключевые слова: теллур, резистентность, фактор селекции, питательные среды, *Vibrio*.

Введение

Теллур (Te) — это редкоземельный элемент, естественное содержание которого в земной коре составляет порядка 10^{-8} частей на миллион [9]. Этот тяжелый металл имеет вид хрупкого серебристо-белого вещества с металлическим блеском, в тонких пластинах приобретает красно-коричневый оттенок, в парах — золотисто-жёлтый, плотность 6,24 г/см³. Он относится к халькогенам с атомной массой 127,60 [26]. Теллур встречается в природе только в виде солей с пятью вариантами валентности, из которых формы (IV) или (VI) являются наиболее биологически значимыми из-за растворимости в воде [22]. Теллур токсичен, попадание в организм может вызывать широкий спектр патологий, включая тошноту, бронхиты, пневмонию. ПДК теллура в воздухе колеблется в пределах 0,007–0,01 мг/м³, в воде 0,001–0,01 мг/л. Канцерогенность теллура на данный момент не подтверждена [15].

Теллур содержится главным образом в золотых и медных рудах. Он нашел широкое применение в промышленности благодаря сочетанию полезных свойств, таких как фотопроводимость, нелинейно-оптический отклик и

термоэлектрическая емкость. Поэтому теллур используют при производстве полупроводников, электронно-оптических приборов, аккумуляторов, солнечных батарей, что в итоге приводит к загрязнению окружающей среды и, как следствие, к выделению резистентных к теллуру бактерий как из клинических проб, так и образцов из внешней среды [12]. Отсутствие доступных простых аналитических методов затрудняет получение сведений о содержании соединений теллура в воде, почве и атмосфере. До недавнего времени сжигание угля рассматривали как основной антропогенный источник теллура, а вулканизм — как естественный. Считается, что 0,006 мг/кг является средним мировым показателем содержания теллура в почве [13]. В морской воде на его долю может приходиться до десятков наногаммов на литр. Столь низкое содержание соединений теллура в окружающей среде предполагает, что у бактерий нет естественных причин вырабатывать к нему устойчивость. Только немногие микроорганизмы, обитающие в экстремальных экологических нишах с более высокой концентрацией соединений теллура, обладают естественной резистентностью. Горнодобывающие предприятия являются источником загрязнения теллуrom, поэтому неудивительно, что в отходах производства обнаружено высокое содержание микроорганизмов, устойчивых к теллуру [12, 37].

Целью настоящего обзора является анализ данных литературы о возможной биологической роли теллура и перспективах его использования в микробиологической диагностике как селективного фактора.

© 2024 г. Евтеев А.В., Водопьянов С.О.

* Автор для переписки:

Евтеев Артем Владимирович

м.н.с. отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций, ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: artemka.evteev@yandex.ru

Биологическая активность теллура

Предполагают, что токсичность теллура связана с образованием активных форм кислорода (АФК), которые вызывают повреждение ключевых компонентов клетки [28]. Анион теллура — TeO_3^{2-} токсичен для большинства бактерий в концентрациях порядка 1 мкг/мл [31]. Это вызывает удивление, поскольку другие химически близкие тяжелые металлы, такие как селен (Se), хром (Cr), железо (Fe), ртуть (Hg), кадмий (Cd) и медь (Cu), приобретают токсичность при концентрациях примерно в 100 раз выше [21]. Механизм взаимодействия бактерий с теллуrom изучен довольно слабо, особенно по сравнению с анионами других металлов, таких как никель (Ni), молибден (Mo), вольфрам (W), железо (Fe) и кобальт (Co) [14, 19]. Восстановление соединений теллура как в аэробных, так и в анаэробных условиях приводит к детоксикации; поэтому микроорганизмы, способные восстанавливать теллур, играют важную роль в природе. Удаление токсичных форм этого вещества может позволить другим видам микроорганизмов расти в средах с повышенным содержанием теллура [19].

Ферменты, ответственные за восстановление соединений теллура, пока не идентифицированы. Так как возможным механизмом детоксикации в природе является восстановление из ионных форм до элементарного состояния, то резистентные бактерии на средах с теллуридом калия образуют черные колонии за счет внутриклеточного отложения атомарного теллура [8, 20].

Уникальный способ нейтрализации токсичности теллура обнаружен у изолированного из морской воды, устойчивого к теллуру штамма дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa*, который способен не только внутриклеточно осаждать атомарный теллур, но и одновременно выделять в атмосферу летучие метилированные соединения теллура. Поскольку использование микробов в качестве «зеленого» способа утилизации отходов, содержащих теллур, признано перспективным, феномен образования летучих соединений Te вызвал большой интерес исследователей. Обнаружено, что непрерывная аэрация способствует продукции летучей формы теллура, одновременно препятствуя образованию атомарной нерастворимой [22].

Аналогичным путем до нейтральной атомарной формы восстанавливается селен и впоследствии откладывается в клеточных мембранах. Так как теллур и селен относятся к той же группе периодической таблицы, что и сера, микроорганизмы, участвующие в круговороте серы, также могут восстанавливать селен. Результаты исследования [23] подтвердили предположение о восстановлении селена одним или несколькими ферментами,

участвующими в диссимиляционном восстановлении нитратов (денитрификации). Полная денитрификация (то есть восстановление нитрата до азота) требует четырех различных соединений: нитрата, нитрита, оксида азота и редуктазы закиси азота. Первый этап восстановления нитратов в *Escherichia coli* осуществляется двумя мембраносвязанными нитратредуктазами (NR), обозначенными A и Z. Первая, NR A, кодируется опероном *narGHJ*, индуцируемым в анаэробных условиях, когда нитрат подавляется кислородом и контролируется глобальным анаэробным регулятором *fnr* [23]. Альтернативное предположение о механизме токсичности теллура заключается в том, что теллур способен заменять серу с неблагоприятными последствиями для метаболизма клеток [38].

В связи с тем, что токсичность теллура может быть связана со способностью окислять некоторые компоненты клеток, неудивительно, что анион теллура вызывает образование одной из АФК — супероксида [28]. Изучение роли продукта гена *btuE* показало, что сверхэкспрессия *btuE* повышала устойчивость клеток к теллуру в четыре раза и к перекиси водорода в 10 раз, но не влияла на устойчивость *E. coli* к кадмию. Аналогичные результаты были получены при воздействии хрома как генератора гидроксильных радикалов. Сходные данные были получены при оценке карбонилирования белков, что позволяет предположить, что *btuE* может участвовать в реакции на окислительный стресс, снижая уровень цитоплазматических АФК. Токсичность теллура зависит от присутствия кислорода, при этом глутатионпероксидазы участвуют в окислительном стрессе [7].

В исследовании на модели *Pseudomonas pseudoalcaligenes* обнаружено существование трех вариантов функционирования дыхательной цепи в присутствии токсичного аниона теллура. Полученные данные подтвердил анализ нескольких устойчивых к теллуриду грам-отрицательных бактерий (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Erwinia* и *Escherichia*), свидетельствующий об активной роли дыхательной цепи переноса электронов; при этом расположение каталитических центров терминальных мембраносвязанных оксидаз коррелировало с периплазматическим или цитоплазматическим расположением восстановленного теллура [33]. Эти наблюдения указывают и на возможность существования нескольких путей функционирования дыхательной цепи *P. pseudoalcaligenes* в процессе накопления элементарного теллура. Вероятно, имеет место вторичное воздействие теллура на звенья метаболических процессов, например, тиоловую окислительно-восстановительную буферную систему, как

это было предложено Trutko S.M. и другими [11, 33]. Тем не менее единого мнения о механизме биологической активности теллура и его влиянии на микроорганизмы в настоящее время нет. Поэтому применение соединений теллура в практике микробиологической диагностики носит во многом эмпирический характер.

Использование сред с добавлением соединений теллура при диагностике различных микроорганизмов

Среды, содержащие растворимый теллурид калия (K_2TeO_3), используются в качестве селективных при выделении микроорганизмов, обладающих относительной резистентностью. Из числа патогенных и условно-патогенных бактерий к невысоким концентрациям теллурида калия устойчивы *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* [2].

Предложено использовать теллурид калия для выявления кишечной палочки, продуцирующей токсин Шига (СТЕС). Использование модифицированной среды Поссе, содержащей 0,5, 1,0 или 1,5 мг/л теллурида калия, показало 100%-ную положительную прогностическую ценность. Среда, содержащая 0,5 мг/л, имела самую высокую чувствительность (100%) и достоверно отличалась от среды, содержащей 1,5 мг/л ($p < 0,05$). При этом наблюдалась обратная зависимость между концентрацией теллурида калия и специфичностью анализа [18].

Для выявления *Candida auris* в клиническом материале и других объектах разработана селективная среда с теллуридом калия, позволяющая проводить идентификацию до вида и исключая ложную идентификацию [4].

Использование солей теллура при диагностике холерного вибриона имеет длительную историю. Теллурид калия используется в нашей стране при проведении лабораторной диагностики за холерой в качестве ингибитора роста сопутствующей микрофлоры [3], в качестве компонентов транспортных сред [1]. Для получения культур холерных вибрионов разработана селективно-дифференциальная питательная среда СЭДХ-М, в состав которой входит 0,1 мкг/мл теллурида калия [5].

Выявлено влияние показателя рН пептонной воды на чувствительность холерного вибриона к теллуриду калия. Например, при рН 7,6–7,8 только в трех случаях из 14 серий получены положительные результаты, а при рН 8,5–9,0 все изучаемые 14 серий теллурида калия были признаны годными. Авторы указывают на необходимость контроля каждой серии теллурида калия

по отношению к холерному вибриону и сопутствующей кишечной микрофлоре [2].

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) теллурида калия для чувствительного штамма *E. coli* BL21(рАСУС184) – 4,5 мкМ (71 мкг/мл) [6].

Оценка чувствительности 13 штаммов *Corynebacterium diphtheriae* к теллуру обнаружила значительную вариацию устойчивости к K_2TeO_3 . При этом минимальные ингибирующие концентрации варьировали от 0,3125 мг/мл до 2,5 мг/мл. Гомологичные нетоксичные штаммы *C. diphtheriae* показали сходные характеристики. Эти данные свидетельствуют о том, что присутствие гена *tox* не влияет на чувствительность к теллуру. Однако штамм *C. diphtheriae* NCTC 13129, выделенный во время последней эпидемии дифтерии в Европе, проявил более высокую устойчивость к теллуру, с минимальной подавляющей концентрацией 2,5 мг/мл. Кроме того, четыре штамма *C. diphtheriae*, вызывающие инвазивные инфекции, и три штамма, полученные во время последней вспышки в Бразилии, также показали устойчивость к теллуру на уровне 2,5 мг/мл [29].

Как известно, в ответ на воздействие тяжелых металлов микроорганизмы могут использовать различные защитные механизмы: элиминация металлов барьером проницаемости; активный транспорт металла из клетки, внутриклеточное секвестрирование металла связыванием с белками, внеклеточное секвестрирование; ферментативная детоксикация металла до менее токсичной формы; уменьшение чувствительности клеточных мишеней к металлам. Было обнаружено, что такие защитные эффекты способствуют адаптации к окислительному стрессу и токсичности металлов. Например, воздействие кадмия обеспечивает клеткам *Xanthomonas campestris* защиту от уничтожения перекисью, а совместное воздействие селена на штаммы *E. coli* повышает устойчивость к ряду металлов, включая теллур [36]. Кроме того, противостоять токсическому действию теллурида позволяет устойчивость микробных культур, которая кодируется генами и может развиваться у исходно чувствительных к нему микроорганизмов.

Гены устойчивости к теллуру у различных микроорганизмов

На сегодняшний день гены, связанные с устойчивостью к теллуру, обнаружены у многих бактерий и в большинстве случаев обусловлены высокоспецифичными генетическими детерминантами [38]. На основе экспериментов по гомологии ДНК и/или гибридизации описано пять высокоспецифичных систем устойчивости бактерий к теллуру, опосредуемых хромосомными или плазмидными генами [11]. Бактерии могут приобретать

высокую устойчивость при трансформации плазмидами с множественной лекарственной устойчивостью, многие из которых кодируют устойчивость и к теллуру [11].

У *E. coli*, устойчивой к теллуру, активация *ter*-оперона вызвала индукцию механизма бактериальной антиоксидантной защиты, включая повышенную экспрессию супероксиддисмутазы, каталазы, оксидоредуктазы и цистеиндисульфуразы. Эта предполагаемая функция подтверждается наблюдением, что экспрессия оперона *ter* в *Proteus mirabilis* связана с активацией окислительного стресса, индуцируемого воздействием теллура [32]. Уропатогенным *E. coli* оперон *ter* обеспечивает преимущество выживания бактерии в макрофагах [35]. Аналогично у *Bacillus anthracis* инактивация генов *yceGH*, обеспечивающих устойчивость к теллуру, приводила к повышению чувствительности к перекиси водорода и противомикробному пептиду кателицидину. Кроме того, эти мутанты стали менее вирулентными, что было показано с помощью модели инфекции на мышах и *Caenorhabditis elegans* [27].

Эпоха секвенирования микробных геномов выявила интересную особенность микроорганизмов, устойчивых к теллуру. Удивительно, но огромное количество резистентных к теллуру микроорганизмов, являются патогенными. Одна из патогенных бактерий, устойчивых к теллуру, — это уропатогенная *E. coli* KL53, несущая два набора *ter*-генов. Учитывая отсутствие какого-либо контакта с теллуrom или его соединениями, причина, по которой желудочно-кишечные и/или уропатогенные микробы содержат в своих геномах кластер генов устойчивости к теллуру (TRGC), остаётся неясной. Однако из-за широкого распространения среди различных клад бактерий было высказано предположение, что TRGC опосредует важную функцию, не связанную напрямую с устойчивостью к теллуру [34].

Бактерии могут приобретать устойчивость благодаря трансформации плазмид, содержащих гены множественной лекарственной устойчивости. Обнаружены плазмиды, обеспечивающие устойчивость к теллуру [19].

Скрининг геномов на наличие оперонов тяжелых металлов и генов биоцидной резистентности *in silico* у штамма *S. enterica* позволили идентифицировать шесть оперонов, опосредующих устойчивость к тяжелым металлам (мышьяку, меди, золоту, ртути, серебру и теллуру), и три гена, связанных с устойчивостью к биоцидам. При этом *ter*-оперон детектирован у 3 из 394 культур или в 0,76% популяции. Опероны *rho*, *sil* и *ars* были обнаружены в составе 11 геномов, что составляет 2,79% от общей популяции. Гены, ассоциированные

с резистентностью к четвертичным аммониевым соединениям, *qacE*, *delta1* и *sugE1*, были обнаружены в геномах 15 и 7 штаммов соответственно, в то время как *qacL* был обнаружен только в двух геномах. Только один геном содержал пять оперонов (золото, серебро, ртуть, медь и мышьяк). Результаты демонстрируют наличие различных оперонов, связанных с устойчивостью к мышьяку, меди, золоту, ртути, серебру и теллуру [30].

Поскольку доступность теллура для бактерий возрастает, это создаст дополнительное селективное давление на популяцию. По аналогии с другими тяжелыми металлами можно ожидать роста и распространения генетических детерминант устойчивости к теллуру среди микроорганизмов, особенно на фоне расширения использования соединений теллура в промышленности [12, 39]. Такая экологическая проблема будет способствовать отбору микроорганизмов, устойчивых к токсическому действию теллура. Так, в ходе исследования из морской среды были выделены 52 устойчивых микроорганизма, способных снижать содержание теллура, причем 18 из них (представители родов *Sulfitobacter*, *Ruegeria*, *Hoeflea*, *Alteromonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Idiomarina* и *Vibrio*) снижали его концентрацию более чем на 90%, что в дальнейшем можно использовать для детоксикации или извлечения теллура из промышленных сточных вод [16].

На сегодняшний день имеется информация о существовании у штамма *V. cholerae* C6706 гена *TehAVc* (VC2323), детерминирующего продукцию протеина, гомологичного белку *TehA*, который опосредует резистентность к теллуру у *E. coli* и входит в семейство белков, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость. Продукт гена *TehA* выполняет функцию мембраносвязанного насоса и обеспечивает лекарственную устойчивость, устойчивость к теллуру и к стрессу, вызванному повышением активных форм азота, которые приводят к повреждению белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот [10]. Установлено, что *TehAVc* оказывал минимальное влияние на устойчивость к теллуру. Несмотря на большое количество изученных антибиотиков, мутанты *tehAVc* и *tehRVc* *V. cholerae* проявляли повышенную чувствительность только к хлорамфениколу. Это свидетельствует о том, что, хотя *TehAVc* оказывает слабое влияние на устойчивость к теллуру и стрессу, он, тем не менее, способствует устойчивости *V. cholerae* C6706 к некоторым антибиотикам. Возможно, *TehAVc* может играть дополнительную, пока неизвестную роль в биологии *V. cholerae*, отличную от устойчивости к антибиотикам [25].

В последнее время базы данных стали удобным инструментом анализа. Разработана открытая база данных «VasMet», содержащая информацию о более 700 подтвержденных генах и более 150 000 предсказанных генах устойчивости к противомикробным препаратам, антибактериальным биоцидам и тяжелым металлам [24].

В базе данных «VasMet» содержатся сведения о генах устойчивости к тяжёлым металлам, но информация о конкретных генах резистентности к теллуру у микроорганизмов рода *Vibrio* отсутствует. Микроорганизмы обладают различными механизмами устойчивости к теллуру, включая присутствие белков, способных метилировать теллур [17].

Однако в базе «VasMet» содержатся данные только о 10 генах устойчивости к теллуру, при этом нет информации о генах резистентности у заведомо устойчивых микроорганизмов родов *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Candida*, *E. coli*. Последнее обновление «VasMet» происходило 11 марта 2018 г., за данный промежуток времени идентифицировано много новых генов устойчивости, но они не учтены. Это свидетельствует о неполноте «VasMet» и необходимости создания более достоверных и доступных баз данных.

Заключение

Высокая токсичность теллура, редко встречающегося в природе, пока не объяснена, хотя выдвинуты интересные гипотезы, нуждающиеся в проверке. Ряд патогенных возбудителей, включая *V. cholerae*, обладает высокой устойчивостью к токсическому действию теллура, что нашло практическое применение при конструировании селективных сред. В настоящее время у различных микроорганизмов идентифицированы генетические детерминанты устойчивости к теллуру, однако отсутствуют сведения о генетической природе устойчивости у *V. cholerae*, несмотря на широкое многолетнее использование соединений теллура в практике лабораторной диагностики холеры. По аналогии с другими тяжелыми металлами можно ожидать роста и распространения генетических детерминант устойчивости к теллуру. Поскольку загрязнение окружающей среды теллуrom повышает вероятность приобретения устойчивости к нему и у обитателей водоемов, перспективными на сегодняшний день являются исследования по изучению ценности диагностических сред, содержащих теллур в качестве фактора селекции, в том числе и для выявления холерных вибрионов.

Литература

1. Лабораторная диагностика холеры «МУК 4.2.3745-22. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы лабораторной диагностики холеры. Методические указания» (утв. Роспотребнадзором 12.05.2022).
2. Лискина И.В., Заболотная О.С. К вопросу проверки и оценки качества теллурида калия, применяемого для выделения холерного вибриона // Проблемы особо опасных инфекций. — 1973. — № 6. — С. 127.
3. Патент № 2039826 С 1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/04 (2006.01), С12N 1/00(2006.01). Способ выделения холерных вибрионов; № 5035399/13: заявл. 01.04.1992; опубл. 20.07.1995 / Малыгина З.В., Кокушкин А.М., Кологоров А.И., Салабуда М.П. — 4 с.
4. Патент № 2788607 С 1 Российская Федерация, МПК С12N 1/16(2006.01). Способ получения питательной среды для селективного выявления *Candida auris*; № 2022114795: заявл. 29.06.2022; опубл. 23.01.2023 / Храмов М.В., Мицевич И.П. — 24 с.
5. Шелухович А.И., Мазрухо А.Б., Харабаджахан Г.Д., Терентьев А.Н., Черникова А.А., Симакова Д.И. Патент № 2484141 С1 Российская Федерация, С12Q 1/20(2006.01), С12Q 1/04(2006.01), С12R 1/01(2006.01). Элективно-дифференциальная питательная среда для выделения холерных вибрионов (варианты); № 2012118446/10, 03.05.2012; опубл. 10.06.2013. — 17 с.
6. Aradská J. et al. Proteomic differences between tellurite-sensitive and tellurite-resistant *E. coli* // PLoS One. — 2013. — Vol. 8. — No. 11. — e78010. doi: 10.1371/journal.pone.0078010.
7. Arenas F.A. et al. The *Escherichia coli* BtuE protein functions as a resistance determinant against reactive oxygen species // PLoS One. — 2011. — Vol. 6. — No. 1. — e15979. doi: 10.1371/journal.pone.0015979.
8. Avazéri C. et al. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite // Microbiology. — 1997. — Vol. 143. — No. 4. — P. 1181–1189.
9. Belzile N., Chen Y.W. Tellurium in the environment: A critical review focused on natural waters, soils, sediments and airborne particles // Applied Geochemistry. — 2015. — Vol. 63. — P. 83–92.
10. Bodenmiller D.M., Spiro S. The yjeB (nsrR) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator // Journal of bacteriology. — 2006. — Vol. 188. — No. 3. — P. 874–881.
11. Di Tomaso G. et al. The membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 cells grown in the presence or absence of potassium tellurite // Microbiology. — 2002. — Vol. 148. — No. 6. — P. 1699–1708.

12. Farias P., Francisco R., Morais P.V. Potential of tellurite resistance in heterotrophic bacteria from mining environments // *Iscience*. — 2022. — Vol. 25. — No. 7. — Art. 104566. doi: 10.1016/j.isci.2022.104566.
13. Filella M. et al. Tellurium in the environment: current knowledge and identification of gaps // *Environmental Chemistry*. — 2019. — Vol. 16. — No. 4. — P. 215–228.
14. Glass J.B., Orphan V.J. Trace metal requirements for microbial enzymes involved in the production and consumption of methane and nitrous oxide // *Frontiers in microbiology*. — 2012. — Vol. 3. — Art. 61. doi: 10.3389/fmicb.2012.00061.
15. Harrison W., Bradberry S., Vale J. (1998-01-28). «Tellurium». International Programme on Chemical Safety. Retrieved 2007-01-12.
16. Horiike T. et al. Diversity of salt-tolerant tellurate-reducing bacteria in a marine environment // *The Journal of General and Applied Microbiology*. — 2019. — Vol. 65. — No. 5. — P. 246–253.
17. Kessi J., Turner R. J., Zannoni D. Tellurite and Selenite: how can these two oxyanions be chemically different yet so similar in the way they are transformed to their metal forms by bacteria? // *Biological Research*. — 2022. — Vol. 55. — No. 1. — Art. 17. doi: 10.1186/s40659-022-00378-2.
18. Lewis G.L., Cernicchiaro N., Moxley R.A. Effect of potassium tellurite concentration in a chromogenic agar medium on isolation of tellurite-resistant «Top Seven» Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from ground beef // *Journal of Food Protection*. — 2023. — Vol. 86. — No. 1. — Art. 100017. doi: 10.1016/j.jfp.2022.11.009.
19. Maltman C., Yurkov V. Extreme environments and high-level bacterial tellurite resistance // *Microorganisms*. — 2019. — Vol. 7. — No. 12. — Art. 601. doi: 10.3390/microorganisms7120601.
20. Moscoso H. et al. Biochemical characterization of tellurite-reducing activities of *Bacillus stearothermophilus* V // *Research in Microbiology*. — 1998. — Vol. 149. — No. 6. — P. 389–397.
21. Nies D.H. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34 // *Extremophiles*. — 2000. — Vol. 4. — No. 2. — P. 77–82.
22. Ollivier P.R.L. et al. Aeration controls the reduction and methylation of tellurium by the aerobic, tellurite-resistant marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa* // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2011. — Vol. 77. — No. 13. — P. 4610–4617.
23. Oremland R.S. et al. Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3 // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1994. — Vol. 60. — No. 8. — P. 3011–3019.
24. Pal C. et al. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database // *Nucleic acids research*. — 2014. — Vol. 42. — No. D1. — D737–D743.
25. Pei B. et al. Role of a TehA homolog in *Vibrio cholerae* C6706 antibiotic resistance and intestinal colonization // *Canadian journal of microbiology*. — 2013. — Vol. 59. — No. 2. — P. 136–139.
26. Piacenza E. et al. Microbial-based bioremediation of selenium and tellurium compounds // *Biosorption*. — 2018. — Vol. 41. — P. 1–8. doi: 10.5772/INTECHOPEN.72096.
27. Ponnusamy D., Clinkenbeard K.D. Role of tellurite resistance operon in filamentous growth of *Yersinia pestis* in macrophages // *PloS One*. — 2015. — Vol. 10. — No. 11. — e0141984. doi: 10.1371/journal.pone.0141984.
28. Pérez J.M. et al. Bacterial toxicity of potassium tellurite: unveiling an ancient enigma // *PloS One*. — 2007. — Vol. 2. — No. 2. — e211. doi: 10.1371/journal.pone.0000211.
29. Santos L.S. et al. *Corynebacterium diphtheriae* putative tellurite-resistance protein (CDCE8392_0813) contributes to the intracellular survival in human epithelial cells and lethality of *Caenorhabditis elegans* // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. — 2015. — Vol. 110. — No. 5. — P. 662–668.
30. Souza S.S.R. et al. Population analysis of heavy metal and biocide resistance genes in *Salmonella enterica* from human clinical cases in New Hampshire, United States // *Frontiers in Microbiology*. — 2022. — Vol. 13. — Art. 983083. doi: 10.3389/fmicb.2022.983083.
31. Taylor D.E. Bacterial tellurite resistance // *Trends in microbiology*. — 1999. — Vol. 7. — No. 3. — P. 111–115.
32. Toptchieva A. et al. An inducible tellurite-resistance operon in *Proteus mirabilis* // *Microbiology*. — 2003. — Vol. 149. — No. 5. — P. 1285–1295.
33. Trutko S.M. et al. Involvement of the respiratory chain of gram-negative bacteria in the reduction of tellurite // *Archives of Microbiology*. — 2000. — Vol. 173. — P. 178–186.
34. Valkovicova L. et al. Protein–protein association and cellular localization of four essential gene products encoded by tellurite resistance-conferring cluster «ter» from pathogenic *Escherichia coli* // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 2013. — Vol. 104. — P. 899–911.
35. Valková D. et al. The contribution of tellurite resistance genes to the fitness of *Escherichia coli* uropathogenic strains // *Open Life Sciences*. — 2007. — Vol. 2. — No. 2. — P. 182–191.
36. Vrionis H.A. et al. Selenite protection of tellurite toxicity toward *Escherichia coli* // *Frontiers in Molecular Biosciences*. — 2015. — Vol. 2. — P. 69. — No. 2. — P. 433–444.
37. Vávrová S. et al. The tellurite resistance gene cluster of pathogenic bacteria and its effect on oxidative stress response // *Folia Microbiologica*. — 2024. — P. 1–12.
38. Walter E.G., Taylor D.E. Plasmid-mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic // *Plasmid*. — 1992. — Vol. 27. — No. 1. — P. 52–64.
39. Zonaro E. et al. Ochrobactrum sp. MPV1 from a dump of roasted pyrites can be exploited as bacterial catalyst for the biogenesis of selenium and tellurium nanoparticles // *Microbial cell factories*. — 2017. — Vol. 16. — No. 1. — Art. 215. doi: 10.1186/s12934-017-0826-2.

References

- Laboratornaya diagnostika kholery «MUK 4.2.3745-22. 4.2. Metody kontrolya. Biologicheskiye i mikrobiologicheskiye faktory. Metody laboratornoy diagnostiki kholery. Metodicheskiye ukazaniya» (utv. Rospotrebnadzorom 12.05.2022) (in Russian).
- Liskina IV, Zabolotnaya OS. K voprosu proverki i otsenki kachestva tellurita kaliya, primenyayemogo dlya vydeleniya kholernogo vibriona. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 1973; 6:127 (in Russian).
- Patent № 2039826 S 1 Rossiyskaya Federatsiya, MPK C12Q 1/04 (2006.01), C12N 1/00(2006.01). Sposob vydeleniya kholernykh vibriinov; № 5035399/13: zayavl 01.04.1992: opubl 20.07.1995. Malykhina ZV, Kokushkin AM, Kologorov AI, Salabuda MP. 4 p (in Russian).
- Patent № 2788607 S 1 Rossiyskaya Federatsiya, MPK C12N 1/16(2006.01). Sposob polucheniya pitatel'noy sredy dlya selektivnogo vyyavleniya *Candida auris*; № 2022114795: zayavl 29.06.2022: opubl 23.01.2023. Khranov M.V., Mitsevich I.P. 24 p (in Russian).
- Shelokhovich AI, Mazrukho AB, Kharabadzhakhyan GD, Terent'yev AN, Chernikova AA, Simakova DI. Patent № 2484141 S1 Rossiyskaya Federatsiya, C12Q 1/20(2006.01), C12Q 1/04(2006.01), C12R 1/01(2006.01). Elektivno-differentsial'naya pitatel'naya sreda dlya vydeleniya kholernykh vibriinov (varianty); № 2012118446/10, 03.05.2012; opubl. 10.06.2013. 17 p (in Russian).
- Aradská J et al. Proteomic differences between tellurite-sensitive and tellurite-resistant *E. coli*. *PLoS One* 2013; 8(11):e78010. doi: 10.1371/journal.pone.0078010.
- Arenas FA et al. The *Escherichia coli* BtuE protein functions as a resistance determinant against reactive oxygen species. *PLoS One* 2011; 6(1):e15979. doi: 10.1371/journal.pone.0015979.
- Avazéri C et al. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology* 1997; 143(4):1181–1189.
- Belzile N, Chen YW. Tellurium in the environment: A critical review focused on natural waters, soils, sediments and airborne particles. *Applied Geochemistry* 2015; 63:83–92.
- Bodenmiller DM, Spiro S. The yjeB (nsrR) gene of *Escherichia coli* encodes a nitric oxide-sensitive transcriptional regulator. *Journal of bacteriology* 2006; 188(3):874–881.
- Di Tomaso G et al. The membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 cells grown in the presence or absence of potassium tellurite. *Microbiology* 2002; 148(6):1699–1708.
- Farias P, Francisco R, Morais PV. Potential of tellurite resistance in heterotrophic bacteria from mining environments. *Iscience* 2022; 25(7):104566. doi: 10.1016/j.isci.2022.104566.
- Filella M et al. Tellurium in the environment: current knowledge and identification of gaps. *Environmental Chemistry* 2019; 16(4):215–228.
- Glass JB, Orphan VJ. Trace metal requirements for microbial enzymes involved in the production and consumption of methane and nitrous oxide. *Frontiers in microbiology* 2012; 3:61. doi: 10.3389/fmicb.2012.00061.
- Harrison W, Bradberry S, Vale J. (1998-01-28). «Tellurium». International Programme on Chemical Safety. Retrieved 2007-01-12.
- Horiike T et al. Diversity of salt-tolerant tellurate-reducing bacteria in a marine environment. *The Journal of General and Applied Microbiology* 2019; 65(5):246–253.
- Kessi J, Turner R J, Zannoni D. Tellurite and Selenite: how can these two oxyanions be chemically different yet so similar in the way they are transformed to their metal forms by bacteria? *Biological Research* 2022; 55(1):17. doi: 10.1186/s40659-022-00378-2.
- Lewis GL, Cernicchiaro N, Moxley RA. Effect of potassium tellurite concentration in a chromogenic agar medium on isolation of tellurite-resistant «Top Seven» Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from ground beef. *Journal of Food Protection* 2023; 86(1):100017. doi: 10.1016/j.jfp.2022.11.009.
- Maltman C, Yurkov V. Extreme environments and high-level bacterial tellurite resistance. *Microorganisms* 2019; 7(12):601. doi: 10.3390/microorganisms7120601.
- Moscoso H et al. Biochemical characterization of tellurite-reducing activities of *Bacillus stearothermophilus* V. *Research in Microbiology* 1998; 149(6):389–397.
- Nies DH. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* 2000; 4(2):77–82.
- Ollivier PRL et al. Aeration controls the reduction and methylation of tellurium by the aerobic, tellurite-resistant marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77(13):4610–4617.
- Oremland RS et al. Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60(8):3011–3019.
- Pal C et al. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic acids research* 2014; 42(D1):D737–D743.
- Pei B et al. Role of a TehA homolog in *Vibrio cholerae* C6706 antibiotic resistance and intestinal colonization. *Canadian journal of microbiology* 2013; 59(2):136–139.
- Piacenza E et al. Microbial-based bioremediation of selenium and tellurium compounds. *Biosorption* 2018; 41:1–8. doi: 10.5772/INTECHOPEN.72096.
- Ponnusamy D, Clinkenbeard KD. Role of tellurite resistance operon in filamentous growth of *Yersinia pestis* in macrophages. *PLoS One* 2015; 10(11):e0141984. doi: 10.1371/journal.pone.0141984.
- Pérez JM et al. Bacterial toxicity of potassium tellurite: unveiling an ancient enigma. *PLoS One* 2007; 2(2):e211. doi: 10.1371/journal.pone.0000211.

29. Santos LS et al. *Corynebacterium diphtheriae* putative tellurite-resistance protein (CDCE8392_0813) contributes to the intracellular survival in human epithelial cells and lethality of *Caenorhabditis elegans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2015; 110(5):662–668.
30. Souza SSR et al. Population analysis of heavy metal and biocide resistance genes in *Salmonella enterica* from human clinical cases in New Hampshire, United States. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13:983083. doi: 10.3389/fmicb.2022.983083.
31. Taylor DE. Bacterial tellurite resistance. *Trends in microbiology* 1999; 7(3):111–115.
32. Topchieva A et al. An inducible tellurite-resistance operon in *Proteus mirabilis*. *Microbiology* 2003; 149(5):1285–1295.
33. Trutko SM et al. Involvement of the respiratory chain of gram-negative bacteria in the reduction of tellurite. *Archives of Microbiology* 2000; 173:178–186.
34. Valkovicova L et al. Protein–protein association and cellular localization of four essential gene products encoded by tellurite resistance-conferring cluster «ter» from pathogenic *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013; 104:899–911.
35. Valková D et al. The contribution of tellurite resistance genes to the fitness of *Escherichia coli* uropathogenic strains. *Open Life Sciences* 2007; 2(2):182–191.
36. Vrionis HA et al. Selenite protection of tellurite toxicity toward *Escherichia coli*. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2015; 2:69(2):433–444.
37. Vávrová S et al. The tellurite resistance gene cluster of pathogenic bacteria and its effect on oxidative stress response. *Folia Microbiologica* 2024:1–12.
38. Walter EG, Taylor DE. Plasmid-mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic. *Plasmid* 1992; 27(1):52–64.
39. Zonaro E et al. *Ochrobactrum* sp. MPV1 from a dump of roasted pyrites can be exploited as bacterial catalyst for the biogenesis of selenium and tellurium nanoparticles. *Microbial cell factories* 2017; 16(1):215. doi: 10.1186/s12934-017-0826-2.

THE EFFECT OF TELLURIUM COMPOUNDS ON MICROORGANISMS. PROSPECTS OF USE

A.V. EVTEEV, S.O. VODOPYANOV

Tellurium is a rare-earth heavy metal that has a toxic effect, the mechanism of interaction of which, compared with other heavy metals, has been poorly studied. It is assumed that the toxicity of tellurium is associated with the formation of reactive oxygen species that cause damage to key cell components or with its ability to replace sulfur with adverse effects on cell metabolism. The comparative resistance of some pathogenic microorganisms to tellurium has led to its use in nutrient media as a selective factor, including in the isolation of *Vibrio cholerae*. Genes related to tellurium resistance have been found in many bacteria. There is isolated evidence of the existence of the *TehAVc* (VC2323) gene in one strain of *V. cholerae* that determines the production of a protein homologous to the *TehA* protein mediating tellurium resistance in *Escherichia coli*. The prospects of further use of tellurium compounds as a selective factor are discussed.

Keywords: tellurium, resistance, selection factor, nutrient media, *Vibrio*.

Address:

Evteev A.V
junior researcher, department of microbiology of Cholera
and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don
Anti-Plague Research Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: artemka.evteev@yandex.ru

Для цитирования:

Евтеев А.В., Водопьянов С.О. Влияние соединений теллура на микроорганизмы. Перспективы использования. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(4):91–98.

For citation:

Evteev A.V., Vodopyanov S.O. The effect of tellurium compounds on microorganisms. Prospects of use. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(4):91–98 (in Russian).

1. *Предметная область.* Принимаются оригинальные и обзорные научные работы по теории, методологии и практике биотехнологии и сопряженных дисциплин: физико-химическая (молекулярная) биология, генная инженерия, геномные и постгеномные технологии, биохимия, биофизика, биоинформатика, микробиология и др.
2. *Общие положения.* Рукописи оформляются в соответствии с общепринятыми требованиями, предъявляемыми к научному исследованию в отношении авторских прав, преемственности, обоснованности целеполагания, достоверности, доказательности, орфографической и стилистической корректности и т.д. В статье должны быть четко обозначены актуальность, научная значимость, методология, цель исследования, результаты и выводы, а также исчерпывающий анализ литературы.
3. Статьи принимаются на русском и английском языках.
4. Объем статьи не должен превышать от 14 до 26 страниц.
5. Оригинальность текста должна составлять не менее 80% (статьи проходят проверку по системе «Антиплагиат»).
6. Для набора текста, формул и таблиц необходимо использовать редактор Microsoft Word для Windows. Параметры текстового редактора: все поля по 2 см; шрифт Times New Roman, размер — 12; межстрочный интервал — 1,5; выравнивание по ширине; абзацный отступ — 1 см; ориентация листа — книжная.
7. Все визуальные объекты должны быть предоставлены в формате, допускающем форматирование. Все файлы рисунков должны быть пронумерованы, а названия рисунков должны быть приведены в конце статьи (например: Рисунок 1. Название рисунка). Любые рисунки (в том числе графики и диаграммы) должны быть информативными как в цветном, так и черно-белом исполнении. Иллюстрации прилагаются в электронном виде в формате JPEG или TIF.
8. Таблицы размещаются в самой статье. Ниже таблицы нужно дать номер таблицы и название (например: Таблица 3. Название таблицы).
9. Оформление мета-данных статьи: 1. Полное название статьи. 2. Укороченный вариант названия статьи (Running title). 3. Ф.И.О. автора статьи. 4. Ученое звание, ученая степень, должность. 5. Место работы: кафедра, факультет, название вуза. 6. Город, страна. 7. Рабочий адрес с почтовым индексом, рабочий телефон. 8. E-mail. 9. Информация о гранте (если есть).
 - Если авторов статьи несколько, то информация повторяется для каждого автора.
 - Возможно при желании сопроводить статью кратким биографическим описанием автора как исследователя (не более 50 слов на английском языке, не более 60 слов на русском языке).
10. Текст статьи должен быть разбит на части, заголовки должны быть подписаны: Аннотация (Abstract). Ключевые слова (Keywords). Введение (Introduction). Материалы и методы (Materials and methods). Литературный обзор (Literature Review). Результаты (Results). Обсуждение (Discussion). Заключение (Conclusion). Благодарности (Acknowledgements). Список литературы (References).
11. Аннотация — оптимальный объем 150 слов (не более 250 слов на русском языке или 200 на английском языке). При этом в случае несоответствия требованию издательство оставляет за собой право частичного изменения и сокращения аннотации. Это же касается и редактирования всего текста рукописи. Аннотация должна включать в себя информацию о цели исследования, методологии, результатах.
12. Ключевые слова — 5–10 слов. Ключевые слова отделяются друг от друга точкой с запятой. Требуется УДК, а также сопроводительное письмо из учреждения.
13. Включить JEL-коды, если применимо.
14. Список литературы приводится в алфавитном порядке, со сквозной нумерацией. Ссылки в тексте на соответствующий источник из списка литературы оформляются в квадратных скобках, например: [1, с. 277]. Использование автоматических постраничных ссылок не допускается. Список литературы

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

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



Подписано к печати 19.01.2025
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,25. Тираж 1000 экз.

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