

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2022 • ТОМ 7 • №1

ISSN 2500-1027

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

И.А.Дятлов, академик РАН, д.м.н., профессор
(Россия)

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редакционный совет

А.П.Анисимов, д.м.н., проф. (Россия)
С.В.Балахонов, д.м.н., проф. (Россия)
А.Н.Куличенко, член-корр. РАН, д.м.н., проф. (Россия)
В.В.Кутырев, академик РАН, д.м.н., проф. (Россия)
Н.В.Рудаков, д.м.н., проф. (Россия)
Сун Чжичжоу (Китай)

Редколлегия

Адъяасүрэн Зэвиймядагийн, к.м.н. (Монголия)	С.Г.Марданлы, д.м.н. (Россия)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)	Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)	В.Л.Мотин, проф. (США)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)	Т.В.Припутневич, д.м.н. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)	А.Ракин (Германия)
Г.А.Каримова, к.б.н. (Франция)	Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
А.В.Карлышев, к.х.н., проф. (Англия)	В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)	Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
М.Косой, к.б.н. (США)	К.Ю.Шаталин, к.б.н. (США)
Ш.Х.О.Курбанов, к.м.н. (Азербайджан)	И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (Россия)
И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)	А.П.Шепелин, д.б.н. (Россия)

Учредитель

© Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Адрес учредителя и редакции:

142279, Московская область,
г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», д. 24,
ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: +7-4967-360003
+7-4967-360046
Факс: +7-4967-360010

E-mail: bacteriology@obolensk.org
info@obolensk.org

Издатель

© «Издательство «Династия»



www.phdynasty.ru

117149, Москва, ул. Азовская, д. 6, корп. 3

Подписано в печать 30.03.2022 г.

Отпечатано: Мастерская печати Old School,
603105, Нижний Новгород, ул. Чачиной, 39а, оф. 5

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Регистрационный номер
ПИ №ФС 77-66792 от 15.08.2016 г.

Журнал «Бактериология»
является рецензируемым изданием.

Выходит четыре раза в год.
Основан в 2016 году.

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.

Тираж 1530 экз. Цена свободная.

Отдел рекламы:
Телефон: +7 495 660-6004
E-mail: reklama@phdynasty.ru

Подписной индекс по объединенному
каталогу «Пресса России»: 39920

Колонка главного редактора

Новые подходы и возможности в применении генетического редактирования бактерий 5

Экспериментальные статьи

Выделение и характеристика бактериоцина штамма *Bacillus subtilis*,
изолированного из пассивной флоры
В.Д.Похиленко, Т.А.Калмантаев, И.А.Дунайцев, К.В.Детушев,
А.А.Кисличкина, Т.Н.Мухина, И.А.Чукина 9

Разработка и оценка качества отечественной питательной среды
для идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*
А.Ю.Иванова, О.В.Полосенко, А.П.Шепелин 18

Состояние кишечной микробиоты у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких
О.Г.Комиссарова, В.А.Шорохова, С.Н.Андреевская, Р.Ю.Абдуллаев 25

Микробиологические процессы в переработке минерального сырья:
растворение различных видов фосфатных руд под действием штамма *Trichoderma asperellum* GJS 03-35
С.К.Жиглецова, И.А.Дунайцев, Т.Н.Кондрашенко, А.В.Ариповский, М.В.Клыкова, Л.В.Коломбет 32

Характеристика культур, выделенных из почвы старого сибиреязвенного скотомогильника
Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов 40

Обзорные статьи

Аффинные теги для очистки рекомбинантных белков
Е.М.Мазурина, М.Е.Платонов, А.С.Трунякова, С.В.Дентовская 47

Соблюдение требований биологической безопасности в диагностических лабораториях
во время пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19)
Е.А.Тюрин, Л.В.Чекан, М.В.Храмов 55

Значимые клинико-лабораторные факторы риска в развитии инфекции
хирургической акушерской раны после кесарева сечения
Д.В.Старикова, Н.В.Богачева 62

Правила оформления статей (основные положения) 68

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, academician of RAS
(Russia)

Executive Secretary

I.G.Govorunov, PhD
(Russia)

Editorial Council

A.P.Anisimov, Sc.D., prof. (Russia)
S.V.Balakhonov, Sc.D., prof. (Russia)
A.N.Kulichenko, corr. member of RAS, Sc.D., prof. (Russia)
V.V.Kutyrev, academician of RAS, Sc.D., prof. (Russia)
N.V.Rudakov, Sc.D., prof. (Russia)
Sun Chzhichzhou (China)

Editorial Board

Ad"yaasyren Zeviiymadagiin, PhD (Mongolia)	I.Kh.Mamatkulov, Sc.D., prof. (Uzbekistan)
I.A.Bazikov, Sc.D., prof. (Russia)	S.G.Mardanly, Sc.D. (Russia)
L.N.Chernousova, Sc.D., prof. (Russia)	T.V.Meka-Mechenko, Sc.D. (Kazakhstan)
S.V.Dentovskaya, Sc.D. (Russia)	V.L.Motin, prof. (USA)
L.V.Domotenko, PhD (Russia)	T.V.Priputnevich, ScD (Russia)
V.A.Gorbunov, PhD (Belarus)	A.Rakin (Germany)
G.A.Karimova, PhD (France)	K.Yu.Shatalin, PhD (USA)
A.V.Karlyshev, PhD, prof. (England)	I.G.Shemyakin, Sc.D., prof. (Russia)
L.V.Kolombet, Sc.D. (Russia)	A.P.Shepelin, Sc.D. (Russia)
M.Kosoi, PhD (USA)	E.A.Svetoch, Sc.D., prof. (Russia)
Sh.Kh.O.Kurbanov, PhD (Azerbaijan)	V.N.Tsarev, Sc.D., prof. (Russia)

Founder and Publisher

© State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Editorial Office:

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Obolensk, Moscow region, 142279
Phone: +7-4967-360003, +7-4967-360046
Fax: +7-4967-360010
E-mail: bacteriology@obolensk.org
info@obolensk.org

Publisher

© «Dynasty» Publishing House



www.phdynasty.ru

Advertising Department:

Phone: +7 495 660 6004; e-mail: reklama@phdynasty.ru

Editor-in-Chief's Introduction

New approaches and opportunities in the application of genetic editing of bacteria **5**

Experimental Articles

Isolation and characteristics of bacteriocin from *Bacillus subtilis* strain, isolated from passiflora
V.D.Pokhilenko, T.A.Kalmantaev, I.A.Dunaytsev, K.V.Detushev, A.A.Kislichkina, T.N.Mukhina, I.A.Chukina **9**

Development and evaluation of the quality of the domestic nutrient medium
for the identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*
A.Yu.Ivanova, O.V.Polosenko, A.P.Shepelin **18**

Gut microbiota state in newly diagnosed and previously treated patients
with pulmonary tuberculosis before the treatment
O.G.Komissarova, V.A.Shorokhova, S.N.Andreevskaya, R.Yu.Abdullaev **25**

Microbiological processing of mineral raw materials:
dissolution of various types of rock phosphates by *Trichoderma asperellum* GJS 03-35
S.K.Zhigletsova, I.A.Dunaytsev, T.N.Kondrashenko, A.V.Aripovsky, M.V.Klykova, L.V.Kolombet **32**

Characteristics of bacterial cultures isolated from the soil of an old anthrax cattle burial ground
L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov **40**

Review Articles

Affinity tags for recombinant protein purification
E.M.Mazurina, M.E.Platonov, A.S.Trunyakova, S.V.Dentovskaya **47**

Biosafety compliance in diagnostic laboratories during the SARS-CoV-2 virus (COVID-19) pandemic
E.A.Tyurin, L.V.Chekan, M.V.Khramov **55**

Significant clinical and laboratory risk factors in the development of purulent-septic complications after cesarean section
D.V.Starikova, N.V.Bogacheva **62**

Instructions for Authors **68**

Новые подходы и возможности в применении генетического редактирования бактерий

С RISPR-Cas-системы быстро вошли в исследовательскую практику как технологическая платформа редактирования геномов бактерий и эукариот, основанная на адаптивной иммунной системе бактерий. В основе этой системы лежат особые участки бактериальной ДНК – короткие палиндромные кластерные повторы, или CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Между повторами находятся различные фрагменты ДНК, называемые спайсерами, которые во многих случаях соответствуют участкам геномов вирусов, с которыми встречалась данная бактерия. При вирусной инвазии чужеродная нуклеиновая кислота вируса выявляется с помощью специальных Cas-белков (CRISPR-associated sequence, ассоциированной с CRISPR), связанных с CRISPR РНК. Если фрагмент генома вируса существует в спейсере CRISPR РНК, Cas-белки разрезают вирусную ДНК и уничтожают ее. Выявленные к настоящему времени системы CRISPR-Cas подразделяют на два основных класса, 5 типов и 16 подтипов на основании наличия или отсутствия определенных генов *cas*, строения оперона *cas*, аминокислотных последовательностей белков Cas и механизмов работы CRISPR-адаптивного иммунитета.



Такова основная схема работы системы, которая в настоящее время широко используется в гено-инженерных разработках для создания диагностических технологий, средств лечения наследственных заболеваний, конструирования продуцентов нужных молекул, элиминации генов резистентности из бактерий и многого другого.

В данном сообщении приводятся некоторые новые сведения о работе и использовании CRISPR-Cas-систем.

Диагностика

На основе CRISPR-Cas разработана быстрая, высокочувствительная и малозатратная технология выявления нуклеиновых кислот, позволяющая осуществить детекцию патогена с одновременным генотипированием. Управляемый РНК, меченый РНК CRISPR-эффektor Cas13a обладает «побочным эффектом» разнородной активности РНКазы, позволяющей распознать мишень. Соединение эффекта Cas13a с изотермической амплификацией (LAMP) для установления основанного на CRISPR диагноза обеспечивает быструю детекцию ДНК или РНК с атомольярной чувствительностью и практически абсолютной специфичностью. Используют Cas13a молекулярную детекционную платформу, называемую SHERLOCK (специфичное высокочувствительное ферментативное репортерное разблокирование, Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing), для детекции штаммов вирусов и бактерий, генотипирования ДНК человека, идентификации опухолевых ДНК-мутаций. Реакционные реагенты SHERLOCK хорошо хранятся в лиофилизированном состоянии, что допускает их использование в полевых условиях [1]. В ГНЦ ПМБ подобная, но несколько модифицированная технология с LAMP-амплификацией реализуется для высокочувствительной детекции особо опасных инфекций, что показано на возбудителе туляремии.

Проблемы при использовании редактирования

Применение генного редактирования весьма эффективно для эукариот, в частности для лечения наследственных заболеваний. Однако этот процесс часто сопровождается появлением нежелательных мутаций, которые могут иметь значение для развития патологических состояний. В настоящее время разработаны методологии оценки данных геномики и транскриптомики отдельных клеток при применении CRISPR-Cas9, позволяющие оценить мутации в преимплантационных эмбрионах человека, которые невозможно было бы выявить традиционными методами генотипирования. Было выяснено, что непреднамеренные результаты редактирования генома присутствуют примерно в 16% проанализированных клеток человеческого эмбриона и охватывают 4–20 т.п.н.

Это говорит о том, что при использовании редактирования генома человеческих клеток, как соматических, так и зародышевых, с помощью CRISPR-Cas9 необходимо иметь в виду непредвиденные последствия и выявлять нежелательные мутации, которые могут привести, в том числе, и к появлению новообразований [2].

Решение проблемы избыточных мутаций при редактировании

Учитывая предыдущие замечания об избыточных мутациях при применении редактирования, следует принять к сведению новую научную информацию. Исследователям удалось модифицировать систему редактирования генома CRISPR-Cas9, снизив количество ошибок практически до нуля. Система CRISPR-Cas9 состоит из эндонуклеазы Cas9, которая способна разрезать двухцепочечную молекулу ДНК, и связанной с ней молекулы РНК, которая по принципу комплементарности позволяет белку найти нужный участок в геноме. Такая система дает возможность редактировать определенные участки ДНК, нацеливаясь на них последовательностью направляющей РНК. Ущербность системы заключается в том, что Cas9 может неспецифично связываться с ДНК в участках, которые не полностью комплементарны направляющей РНК. Фермент может нарушить последовательности важных генов, что было основной преградой к применению системы CRISPR-Cas9 на человеке. Для решения данного вопроса были заменены три аминокислотных остатка в Cas9 из бактерии *Streptococcus pyogenes*, что привело к сильному снижению частоты неспецифических разрезов этим ферментом. Удалось предсказать, что замена некоторых положительно заряженных аминокислот в одном из регионов на нейтральные сделает неспецифическое связывание более слабым. При исследовании нескольких замен было установлено, что мутации трех аминокислотных остатков настолько снижают число неспецифических разрезов, что они не обнаруживаются вовсе. Новый фермент под названием eSpCas9 в ближайшее время планируется сделать общедоступным [3].

Нейросети CRISPR/Cas. Появились сообщения о том, что российскими биоинформатиками из Сколтеха была разработана новая конфигурация нейронной сети, способная предсказать, насколько точно выбрана РНК для редактирования генома с помощью CRISPR-Cas. Применено глубокое обучение, гауссовские процессы и другие методы для более точного выбора оптимальных направляющих РНК. В результате была создана нейросеть, способная к обучению благодаря наличию «памяти» и адаптирующаяся к режимам тренировок. Данная нейросеть оценивает вероятности разрезания ДНК-мишеней в необходимом месте для заданных гидовых РНК. Это может служить основой для выбора инструмента редактирования в технологии, основанной на CRISPR-Cas [4].

Компьютерное моделирование является еще одним подходом к решению проблем с избыточными мутациями при применении генетического редактирования.

Обнаружение CRISPR-ассоциированных транспозонов. Обнаружено большое количество генных кластеров, которые используют CRISPR для собственного копирования. Исследователи определили кластеры генов, которые используют CRISPR для встраивания в разные места генома организма, как CRISPR-ассоциированные транспозоны (CAST), которые можно использовать для включения в геном целого гена или большой последовательности бактериальной ДНК. До использования сверхмощного компьютера было известно около 12 CAST, сейчас их обнаружено порядка 1500. Имея такую базу данных, можно выбирать наиболее точный инструмент для редактирования генома и создавать новые более эффективные системы редактирования.

Использование суперкомпьютеров для решения задач редактирования открывает совершенно новые перспективы для решения задач по вставке в геном «генных кассет», кодирующих множество функций, и лечения сложных генетических заболеваний.

Использование ретронов для редактирования

Разработан еще один метод генетического редактирования, имеющий выраженные прикладные перспективы. В отличие от существующих методов, основанных на CRISPR-Cas-направленных разрывах генома для редактирования генома, эта стратегия использует одноцепочечную ДНК, продуцируемую ретронным элементом для рекомбинации. Это позволяет создавать библиотеки из миллионов элементов и использовать естественную ДНК или случайные вариации в качестве входных данных.

Метод основан на еще одном защитном механизме бактерий с использованием ретронов, которые представляют собой фрагмент одноцепочечной ДНК, прикрепленный к фрагменту РНК в результате реакции обратной транскрипции. Путем последовательных экспериментов по оптимизации постановки реакции и изменения фенотипа бактерий в отношении синтеза ряда ферментов эффективность метода удалось повысить до 90% и более, что выше, чем при CRISPR-редактировании. Кроме того, таким способом можно маркировать мутантные клетки для их идентификации при экспериментах, что показано на мутациях кишечной палочки в отношении индукции антибиотикорезистентности. Одним из вариантов применения метода с использованием ретронов является индукция небольших мутаций в геноме для определения возможностей адаптации бактериальных клеток к внешним условиям [5].

Редактирование микробиома. Микробиом кишечника человека играет роль в возникновении аутоиммунных заболеваний, диабета, рака, сердечно-сосудистых заболеваний, болезни Паркинсона, Альцгеймера, рассеянного склероза, влияет на когнитивные функции, формирование памяти и т.д. Нарушение кишечной микробиоты чаще всего происходит при воздействии на организм патогенных микроорганизмов (бактерий и вирусов), антибиотиков, консервантов, при отравлении химическими веществами, в т.ч. дезинфектантами. Уже хорошо известны методы направленной элиминации из кишечника патогенных бактерий, несущих гены антибиотикорезистентности, когда не затрагиваются полезные микроорганизмы. Эти работы находятся еще в стадии лабораторных исследований, но уже имеют выраженные перспективы практического применения.

Кишечная палочка выполняет важные функции в кишечнике человека, однако имеются разнообразные патогенные варианты, несущие токсины, которые могут вызывать тяжелые заболевания, поражающие кровь и почки, – энтерогеморрагические и энтероагрегативные формы.

В одном из исследований был разработан бактериофаг M13, специфично поражающий кишечную палочку. Эффект основан на доставке с помощью бактериофага системы CRISPR-Cas9 целевым бактериям, что сопровождается разрушением хромосомы. Лабораторные мыши были заражены вирулентным штаммом, который преобладал в кишечной микробиоте. Через 2 нед. после начала лечения разработанным методом его в кишечнике осталось менее 1%, что говорит о высокой эффективности элиминации. Это пока феноменологический эффект, показывающий принципиальную возможность подхода. Существует множество механизмов у кишечной палочки для противостояния такому фагу, приводящих даже к потере CRISPR-Cas9-системы. Но наличие эффекта от подобной платформы обнадеживает в отношении использования других фагов для повышения эффективности воздействия на патогены, что может послужить также одним из методов борьбы с резистентными клонами [3].

Редактирование микробных сообществ. На сегодняшний день ферменты CRISPR используются для редактирования геномов одного типа клеток за один раз: они вырезают, удаляют или добавляют гены у определенного вида клеток в ткани или органе, например, или у одного вида микроорганизмов. Появились сообщения о возможности технологии редактирования генома с CRISPR-Cas9-системой, позволяющей изменять гены в сообществе многих различных видов одновременно, что может быть определено как «редактирование сообщества микроорганизмов». Это важное направление может оказаться наиболее эффективным при восстановлении микробиоты человека после воздействий патогенов, антибиотиков или химических веществ, а также при лечении дисбиозов. До настоящего времени нет убедительных данных о взаимоотношениях нормальной микробиоты в организме человека, о специализации отдельных видов и их работы для поддержания собственной многокомпонентной популяции и ее значения для обеспечения многих жизненно важных функций человека посредством метаболитов.

При создании концепции редактирования сообщества был разработан подход, позволяющий определить, какие микроорганизмы в сообществе могут быть подвергнуты редактированию генов. Исследователи использовали в качестве зонда транспозон, который внедрялся

случайным образом в геномы бактерий. Секвенированием ДНК до и после введения транспозона можно было точно определить, какой вид микробов включил ген транспозона. Была разработана система адресной доставки под названием «ДНК-редактирующая РНК-направленная CRISPR-Cas-транспозаза», которая использует фермент CRISPR-Cas, подобный CRISPR-Cas9, для наведения на определенную последовательность ДНК и вставки транспозона. Из выделенных бактерий было создано стабильное сообщество из 14 различных типов микроорганизмов. При этом исследователи смогли отредактировать часть штаммов *Escherichia coli* в этом сообществе, воздействуя на гены, связанные с развитием заболеваний [6].

Этот первый опыт редактирования микробных сообществ позволяет рассчитывать на развитие данной методологии, что представляется важным для создания новых технологий лечения заболеваний кишечника, включая воздействие патогенных штаммов, резистентных к антимикробным препаратам.

Оценивая сегодняшнее состояние проблемы использования генного редактирования для медицинских целей, следует отметить интенсивно развивающиеся методологии, направленные на создание действенных инструментов, способных эффективно применяться для лечения инфекционных болезней у людей, обогащая одновременно теоретическую базу понимания взаимодействия множества микроорганизмов в микробиоме человека и влиянии данных процессов на его жизнедеятельность на метаболическом уровне.

*Директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии» Роспотребнадзора, академик РАН
И.А.Дятлов*

Литература

1. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017 Apr 28;356(6336):438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321
2. Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, Fogarty NME, Kubikova N, Hardman E, et al. Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jun 1;118(22):e2004832117. DOI: 10.1073/pnas.2004832117
3. Lam KN, Spanogiannopoulos P, Soto-Perez P, Alexander M, Nalley MJ, Bisanz JE, et al. Phage-delivered CRISPR-Cas9 for strain-specific depletion and genomic deletions in the gut microbiome. *Cell Rep*. 2021 Nov 2;37(5):109930. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109930
4. Kirillov B, Savitskaya E, Panov M, Ogurtsov AY, Shabalina SA, Koonin EV, Severinov KV. Uncertainty-aware and interpretable evaluation of Cas9-gRNA and Cas12a-gRNA specificity for fully matched and partially mismatched targets with Deep Kernel Learning. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 25;50(2):e11. DOI: 10.1093/nar/gkab1065
5. Schubert MG, Goodman DB, Wannier TM, Kaur D, Farzadfar F, Lu TK, et al. High-throughput functional variant screens via *in vivo* production of single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 May 4;118(18):e2018181118. DOI: 10.1073/pnas.2018181118
6. Rubin BE, Diamond S, Cress BF, Crits-Christoph A, Lou YC, Borges AL, et al. Species- and site-specific genome editing in complex bacterial communities. *Nat Microbiol*. 2022 Jan;7(1):34-47. DOI: 10.1038/s41564-021-01014-7

Выделение и характеристика бактериоцина штамма *Bacillus subtilis*, изолированного из пассифлоры

В.Д.Похиленко, Т.А.Калмантаев, И.А.Дунайцев, К.В.Детушев, А.А.Кисличкина, Т.Н.Мухина, И.А.Чукина

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В цели данного исследования входило обнаружение, отработка способа выделения и оценка свойств бактериоцина сапрофитной спорообразующей бактерии *Bacillus subtilis*, изолированной из растения пассифлоры. Обнаружено, что в условиях анаэробно-ионолитического и глубинного культивирования синтез штамм *B. subtilis* продуцирует два низкомолекулярных пептида – 3,4 и 5,9 кДа, накапливаемых в ферментате. С помощью методов электрофореза проб и последующего биотестирования полиакриламидной гелевой пластины показано, что антимикробной активностью обладает лишь пептид с молекулярной массой 3,4 кДа. Был отработан способ выделения активного вещества из смеси пептидов и определена его удельная активность. Молекулярная масса активного пептида, подтвержденная методом масс-спектропии (MALDI TOF-MS), соответствует субтилозину А – одному из 9 бактериоцинов, описанному у *B. subtilis*. Пептид переносит кипячение, перепады pH в широком диапазоне (2–10 ед.), но разрушается протеолитическими ферментами, что свойственно лантибиотикам – группе бактериоцинов класса I. Выделенный пептид (3,4 кДа) активен в отношении таких групп патогенных бактерий, как *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*, что делает его привлекательным для использования в качестве доступного антимикробного природного происхождения

Ключевые слова: пептид, бактериоцин, *Bacillus subtilis*, выделение, свойства, антимикробная активность

Для цитирования: Похиленко В.Д., Калмантаев Т.А., Дунайцев И.А., Детушев К.В., Кисличкина А.А., Мухина Т.Н., Чукина И.А. Выделение и характеристика бактериоцина штамма *Bacillus subtilis*, изолированного из пассифлоры. Бактериология. 2022; 7(1): 9–17. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-9-17

Isolation and characteristics of bacteriocin from *Bacillus subtilis* strain, isolated from passiflora

V.D.Pokhilenko, T.A.Kalmantaev, I.A.Dunaytsev, K.V.Detushev, A.A.Kislichkina, T.N.Mukhina, I.A.Chukina

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The purpose of this study was to detect, develop a method for isolating and evaluating the properties of bacteriocin of a saprophytic spore-forming bacterium *Bacillus subtilis* isolated from a passionflower plant. It was found that under the conditions of anaerobiosis and submerged synthesis, the *B. subtilis* strain produces two low molecular weight peptides, 3.4 and 5.9 kDa, accumulated in the fermentate. By the methods of sample electrophoresis and subsequent biotesting of a polyacrylamide gel plate, it was shown, that only a peptide with a molecular weight of 3.4 kDa has antimicrobial activity. A method for isolating the active substance from a mixture of peptides has been developed and its specific activity was determined. The molecular weight of the active peptide, confirmed by mass spectroscopy (MALDI TOF-MS), corresponds to subtilisin A, one of the 9 bacteriocins described in *B. subtilis*. The peptide tolerates boiling, pH fluctuations in a wide range (2–10 units), but is destroyed by proteolytic enzymes, which is characteristic of lantibiotics, a group of class I bacteriocins.

The isolated 3.4 kDa peptide is active against such groups of pathogenic bacteria as *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. The peptide is attractive for use as an available antimicrobial of natural origin.

Key words: peptide, bacteriocin, *Bacillus subtilis*, isolation, properties, antimicrobial activity

For citation: Pokhilenko V.D., Kalmantaev T.A., Dunaytsev I.A., Detushev K.V., Kislichkina A.A., Mukhina T.N., Chukina I.A. Isolation and characteristics of bacteriocin from *Bacillus subtilis* strain, isolated from passiflora. Bacteriology. 2022; 7(1): 9–17. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-9-17

Для корреспонденции:

Похиленко Виктор Данилович, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, территория «Квартал А», 24, ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0027

E-mail: pokhilenko@obolensk.org

Статья поступила 18.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Victor D. Pokhilenko, PhD, DSc (Technical Sciences), Leading Researcher of Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0027

E-mail: pokhilenko@obolensk.org

The article was received 18.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

B *acillus subtilis* – широко распространенная и хорошо известная грамположительная спорообразующая бактерия, производящая более двух десятков антимикробных веществ (АМВ), большинство из которых имеют пептидную природу [1]. Существует два основных пути биосинтеза этим микроорганизмом такого рода пептидов: с помощью поликетидсинтеза без участия рибосом и на рибосомах [2]. Бактериоцины – группа синтезируемых на рибосомах пептидов, способных убивать генетически близкородственные штаммам-продуцентам микроорганизмы [3]. В связи с этим бактериоцины часто рассматриваются в качестве собственного «оружия» некоторых бактерий, помогающего конкурировать за пищу и защищать себя в природе. Бактериоцины молочнокислых бактерий, от которых, собственно, и возникла вся история этой группы природных антибиотиков, были впервые описаны еще несколько десятилетий тому назад, и к настоящему времени некоторые из них (низин, субтилин, эпидермин, галлидермин, пер-5, эрицин, субтилин, субтилозин) нашли широкое применение в пищевой и мясо-молочной промышленности [4]. В последние годы бактериоцины стали представлять интерес в качестве антимикробных соединений для применения в фармацевтической, сельскохозяйственной и биохимической промышленности [5], а также при лечении инфекций, вызываемых возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью [6, 7].

Следует особо подчеркнуть, что по сравнению с традиционными антибиотиками или пищевыми консервантами бактериоцины не токсичны для человеческого организма, поскольку наши клетки не имеют рецептора, распознаваемого бактериоцинами и благодаря которому они запускают механизм образования пор в мембране [8, 9]. Поскольку бактериоцины синтезируются на рибосомах и структурные гены могут быть легко изменены генетически, они интересны еще и своей возможностью служить отличными инструментами для геной инженерии новых АМВ. В настоящее время считается, что более 99% бактерий могут продуцировать по крайней мере один тип бактериоцинов, однако большинство из них еще только предстоит изучить [10]. Бактериоцины на основании данных по молекулярной массе, термостабильности, чувствительности к ферментам, механизму действия принято подразделять на 4 класса [11]. Большинство бактериоцинов, продуцируемых видами *Bacillus*, относятся к первому (I) классу [12]. Бактериоцины этого класса из-за содержащегося в них лантионина (редкой тиоэфирной аминокислоты) принято называть лантибиотиками [13]. У представителей рода *Bacillus* выделены и описаны такие лантибиотики, как субтилин, субтилозин А, эрицин, мерсацидин, субтиломицин, субланцин, эпидермин [14, 15]. Технология их выделения базируется в основном на методах мембранной фильтрации, экстракции в системе органических растворителей и хроматографии [16]. Методы экстракции в органических растворителях дают возможность выделять вещество из значительного объема ферментата, но не лишены недостатков.

Следует заметить, что бактериоцины, образуемые *Bacillus* spp., демонстрируют более широкий антимикробный спектр, чем большинство бактериоцинов молочнокислых бактерий [17, 18]. Считается, что в биосинтезе различных антимикробных соединений участвует 4–5% генома *B. subtilis* [1]. У этого

вида бацилл найдено 6 бактериоцинов – субтилин, эрицин S, эрицин А, мерсацидин, субланцин 168 и субтилозин [18–21]. Если первые пять близки к низину молочнокислых бактерий, имеющему линейную структуру, то субтилозин представляет собой циклическую молекулу из 35 аминокислот, что наделяет его новыми свойствами.

Таким образом, виды из рода *Bacillus* представляют собой большой пул для скрининга и открытия новых бактериоцинов [22]. В этом исследовании мы получили и охарактеризовали противомикробный пептид от *B. subtilis* П19, штамма, выделенного нами из растительной массы пассифлоры. Этот новый бактериоцин, по характеристикам соответствующий субтилозину, может служить в качестве основы противомикробного средства или пищевым консервантом, и этим он представляет практический интерес.

Материалы и методы

Штамм, способ идентификации и условия выращивания. Штамм был выделен из растительного сырья – страстоцвета (*Passiflora edulis*), на практике используемого для приготовления иммуномодуляторной пищевой добавки «Пассифлора» («Фарм-про», Россия). На основе изучения культурально-морфологических, биохимических признаков штамм был отнесен к виду *subtilis* из рода *Bacillus*. На основании MALDI-TOF Biotyper (Bruker) штамм определен с высокой долей вероятности (2,32–2,357) как *B. subtilis*. Видовая принадлежность штамма была также подтверждена методом генотипирования по 16S РНК. Штамм П19 *B. subtilis* в лиофилизированном виде хранится в государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск» под инв. № В-8711.

Субкультивирование штамма проводили на чашках Петри с питательным агаром (Nutrient Agar M001, HiMedia, Индия), ГРМ-агаром («Питательные среды», Оболенск, Россия) либо крахмальным агаром (Starch agar, Ref.1-283, Scharlau, EU) при 30°C и 36°C в течение суток. Выросшие посевы просматривали на биологическую однородность и в дальнейшую работу брали чашки с типовыми для штамма колониями. Из клеточной массы, собранной с поверхности агаризованной питательной среды (в основном ГРМ-агара), готовили взвеси клеток с применением бактериального стандарта мутности по Мак-Фарланду, равного 4 единицам (около $1,2 \times 10^9$ /мл по КОЕ).

Клеточными суспензиями в количестве 1% (по объему) засеивали 750 мл колбы Эрленмейера со 100 мл питательной среды. Инкубацию посевов осуществляли на качалке (36°C, 130 об./мин). На этапе выбора питательных сред использовали как готовые коммерческие составы (например, ГРМ-бульон), так и экспериментальные варианты (табл. 1).

Оценка показателей культуральной жидкости. После остановки инкубации в пробах культуральной жидкости (КЖ) определяли кислотность (рН), концентрацию живых клеток, каталазную и антимикробную активность. При этом концентрацию жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) оценивали культуральным методом с посевом разведений пробы на ГРМ-агар и последующим подсчетом выросших колоний. Антимикробную активность оценивали нанесением 10 мкл проб КЖ и бесклеточного супернатанта КЖ на поверхность свежезасеянного газона с тест-штаммом микроба. Если по-

Таблица 1. Варианты прописей, используемых при выборе питательных сред

Компоненты	Наименование основы среды и концентрация компонентов*, г/л											
	ГРМ	АС	АТ	ФС	ГК	ДЭ	ДС	ГКД	М	Т	АХ	
ГРМ-бульон	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Гидролизат казеина	–	–	–	–	10	–	–	10	–	–	–	–
Дрожжевой экстракт	5	5	5	5	–	5	5	5	–	–	–	–
Магния сульфат	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Аммония сульфат	–	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Аммония тартрат	–	–	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Сахароза	2	2	2	2	–	–	7	7	7	7	7	7
Фруктоза	–	–	–	5	7	–	–	–	–	–	–	–
Мочевина	–	–	–	–	–	–	–	–	7	–	–	–
Тиомочевина	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	7	7
Аммония хлорид	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7

* ГРМ – гидролизат рыбной муки, АС – аммония сульфат, АТ – аммония тартрат, ФС – фруктоза и сахароза, ГК – гидролизат казеина, ДЭ – дрожжевой экстракт, ДС – ДЭ и сахароза, ГКД – ГК и ДЭ, М – мочевина, Т – тиомочевина, АХ – аммония хлорид.

казатели pH на момент определения находились в пределах 6,5–7,5 ед., а при добавлении 6%-й перекиси водорода к ферментату (1:1) происходило интенсивное выделение водорода в виде пенообразования, то КЖ брали в переработку.

Выделение АМВ проводили по методу, описанному в статье [23]. Для этого пробы КЖ *B. subtilis* П19 разделяли центрифугированием (5000 об./мин), а супернатанты концентрировали в 5–10 раз упариванием под вакуумом при температуре 50–60°C на ротационном испарителе Heidolph Laborota 4000 (Германия). Далее по 35 мл сконцентрированных супернатантов смешивали с 8,8 мл н-бутанола (1/4 часть от объема) в течение 15 мин, после чего их помещали в холодильник на ночь для разделения фаз. Отбирали верхний прозрачный слой желтоватого цвета, содержащий биологически активный материал в бутанольной фракции, и высушивали в шкафу при температуре 105°C до полного удаления растворителя. Преципитат растворяли в небольшом объеме фосфатного буфера, позволяющего получить прозрачный раствор АМВ, и далее очищали пропусканием через хроматографическую колонку С18.

Тестирование АМВ. Титр активности АМВ определяли нанесением по 10 мкл последовательных разведений (1:1) на свежесазеянные газоны индикаторных штаммов грамположительных бактерий (листерии, бациллы). Устойчивость к нагреву проверяли кипячением образца (10 мин), конвективным высушиванием (+105°C, 20 мин). Устойчивость к действию протеолитических ферментов исследовали в условиях, имитирующих физиолого-биохимические параметры процесса пищеварения человека и животных [24, 25]. Молекулярную массу оценивали методами электрофореза в системе Tris-tricine SDS-PAG (18%) с пептидными маркерами PageRuler™ LowRange и масс-спектропии по MALDI-TOF.

Генетические анализы. ДНК извлекали из ночной культуры *B. subtilis* с использованием набора геномной ДНК (Promega Corp., Madison, WI, США), ЭДТА (0,5 моль/л, pH 8,0), лизоцима (20 мг/мл), протеиназы К (20 мг/мл) и мутанолизина (2,5 Ед/мкл). Полученную ДНК очищали с помощью спиновых колонок и элюировали в 100 мкл воды, не содержащей нуклеаз. Для выявления бактериоцинов

B. subtilis был проведен ПЦР-анализ, в котором использовали праймеры генома *B. subtilis* (GenBank AJ430547) для специфического распознавания функциональных генов субтилина (*spaS*) и субтилозина (*sboA*).

Математическая обработка результатов. Статистическая обработка результатов проводилась с определением стандартного отклонения [26] с использованием программы Excel 2016. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $p > 0,05$ за достоверный уровень значимости.

Результаты исследований

Морфология. Бактерии *B. subtilis* П19 палочковидные, грамположительные, имеют размер 2–4 × 0,4–0,6 мкм, после деления остаются соединенными в короткие цепи (рис. 1). В клетках просматриваются проспоры, которые не раздувают клетку бактерии и располагаются в ее центре. Клетки подвижные, с перитрихальным расположением жгутиков. Споры овальные, не превышающие размер клетки, расположены преимущественно центрально.

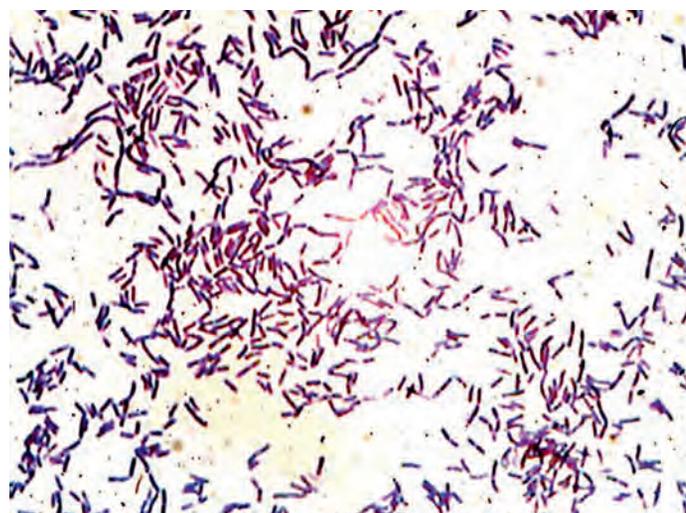


Рис. 1. Морфология клеток штамма *B. subtilis* П19, выращенных при 36°C на ГРМ-агаре в течение суток. Окраска по Граму, ×1250. Микроскоп модели Eclipse E200 (Nikon, Китай).

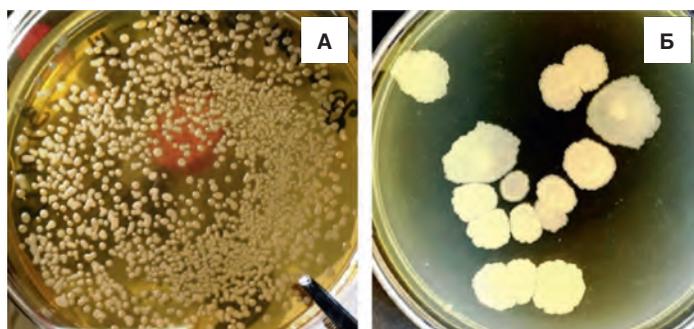
Таблица 2. Активность супернатантов КЖ в зависимости от среды роста штамма

Вариант среды роста*	Диаметр зоны ингибирования тест-штамма, мм		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
ГРМ	Следы	6 ± 0,5	19 ± 2
АС	0	0	12 ± 1
АТ	0	0	10 ± 1
ФС	0	0	6 ± 1
ГК	3	11 ± 0,5	24 ± 3
ДЭ	0	5 ± 0,5	13 ± 1
ДС	0	7 ± 2	18 ± 2
ГКД	4 ± 0,5	15 ± 1	27 ± 3
М	0	14 ± 2	20 ± 2
Т	0	10 ± 1	7 ± 1
АХ	0	0	15 ± 2

* ГРМ – гидролизат рыбной муки, АС – аммония сульфат, АТ – аммония тартрат, ФС – фруктоза и сахароза, ГК – гидролизат казеина, ДЭ – дрожжевой экстракт, ДС – ДЭ и сахароза, ГКД – ГК и ДЭ, М – мочевины, Т – тиомочевина, АХ – аммония хлорид.

Культуральные свойства. Штамм *B. subtilis* П19 хорошо растет на агаризованных питательных средах промышленного изготовления, включая ГРМ-агар («Питательные среды», Оболенск), крахмальный агар (HiMedia, Индия). Оптимум роста $36 \pm 1^\circ\text{C}$, а оптимальная продолжительность глубинного выращивания в колбах при 120–150 об./мин составила 18 ч. Суточные колонии штамма выпуклой округлой формы, светло-бежевые (рис. 2а), легко снимаются с поверхности агара при помощи бактериологической петли. Одиночные колонии быстро разрастаются на питательном агаре, достигая за 3 суток 10–20 мм в диаметре (рис. 2б). При этом они не высыхают, оставаясь на вид увлажненными. Клетки штамма предпочитают расти в аэробных условиях с интенсивной продукцией каталазы.

Физиолого-биохимические свойства. Бактерии штамма ферментируют глюкозу, сахарозу, маннит и мальтозу. Дают положительную реакцию Фогес–Проскауэра, гидролизуют крахмал, желатину, не гидролизуют мочевины, утилизируют цитрат натрия с глюкозой, не используют пропионат и малонат натрия, не расщепляют тирозин. Вырабатывают каталазу, протеазы, амилазу, не образуют лецитиназу, уреазу и липазу. Редуцируют нитраты, не образуют газ на среде с нитратами в анаэробных условиях, не образуют индол и сероводород. В процессе аэробного культивирования клетки

Рис. 2. Морфология колоний штамм *B. subtilis* П19, выращенных при 36°C на ГРМ-агаре. А – суточная, Б – трехсуточная чашка.

выделяют в окружающую среду соединения, ингибирующие рост некоторых штаммов грамположительных микроорганизмов – *Listeria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*. Штамм устойчив к полимиксину, лизоциму, чувствителен к пенициллину, стрептомицину, эритромицину, тетрациклину и новобиоцину.

Штамм может храниться без потери свойств при температуре $5\text{--}10^\circ\text{C}$ на ГРМ-агаре не менее 6 мес. с обязательным пересевом не реже 1 раза в 2 мес., в замороженном виде при -10°C – не менее 12 мес. Для длительного хранения штамма предпочтительна лиофилизация.

Выбор питательной среды и условий биосинтеза АМВ. В экспериментах по выбору компонентного состава питательной среды было установлено, что пропись в составе гидролизата казеина, дрожжевого экстракта и сахарозы с добавками солей магния (ГКД) показала самые высокие результаты по биосинтезу штаммом АМВ в условиях глубинного культивирования (табл. 1, 2). Кроме того, из клеток, выросших на этой среде, элюирование АМВ происходило более полно, что и определило ее использование во всех последующих экспериментах.

Выбор условий выделения АМВ из КЖ. На получение образцов АМВ из КЖ *B. subtilis* П19 по методу Babasaki [23] уходило более суток, к тому же использовалось токсическое вещество *n*-бутанол. Согласно [27], предельно допустимая (среднесменная, за 8 ч) концентрация паров этого вещества составляет 10 мг/м^3 , а максимальная разовая – 30 мг/м^3 . Чтобы повысить производительность процесса и минимизировать вредное воздействие растворителей на организм человека, нами предпринята попытка разработать новый метод выделения АМВ из *B. subtilis* П19.

Суть разработки состояла в использовании эффекта центрирования бактериоцина на клетках продуцента в кислой среде, ранее описанного в литературе [28]. Для этого КЖ закисляли соляной кислотой до 2,5–2,7 ед., центрифугировали, супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в небольшом объеме воды, а концентрат раскисляли щелочью до нейтральных значений. Затем его обрабатывали 96°C -м этанолом (1:1) и вновь центрифугировали, а водно-спиртовой супернатант досуха упаривали. Полученный преципитат растворяли в фосфатном буфере и далее тестировали для определения природы АМВ. Это позволяло, во-первых, снизить объемы перерабатываемых жидкостей, во-вторых, отказаться от использования токсического растворителя и, в-третьих, сократить время выделения АМВ из КЖ.

Сравнительный анализ описанного в литературе и разработанного нами метода [29] показал существенное его преимущество по времени и безопасности осуществления. Использование приема закисления КЖ и смыва этанолом осевшего на клетках бактериоцина занимало не более 5 ч, тогда как по удельной активности пробы АМВ, полученные существующим и ранее описанным методами, были сопоставимы – в среднем по 6400 АЕ/мл . При этом выход целевого вещества в виде водного раствора без обработки бутанолом составлял 89,6% (табл. 3).

Изучение состава АМВ. После проведения масс-спектрографии образцов АМВ методом MALDI-TOF в нем были выявлены два вещества пептидной природы с пиками в 3,4 и 5,9 кДа (рис. 3). На спектрограмме MALDI-TOF ука-

Таблица 3. Показатели АМВ по активности и выходу в процессе выделения по [29]

Образец и его объем, мл	Антимикробная активность		Выход, %	
	АЕ/мл	АЕ/на объем образца		
КЖ	1000	150 ± 50	150000	100
Супернатант бесклеточный	980	15	14700	9,8
ЭКП после удаления спирта и разведения в воде	21	6400	134400	89,6

ЭКП – экстракт клеточной поверхности; АЕ – арбитражные единицы. В качестве индикаторного штамма использовали *L. monocytogenes* 766.

занные пики полностью исчезали после обработке пробы АМВ протеолитическими ферментами, что указывает на их белковую природу. В то же время антимикробные свойства обнаруженных веществ оставались пока неизвестными. Для ответа на этот вопрос был проведен гель-электрофорез АМВ в системе Tris-tricine SDS-PAGE (18%). Последующее биотестирование гелевой пластины на индикаторном штам-

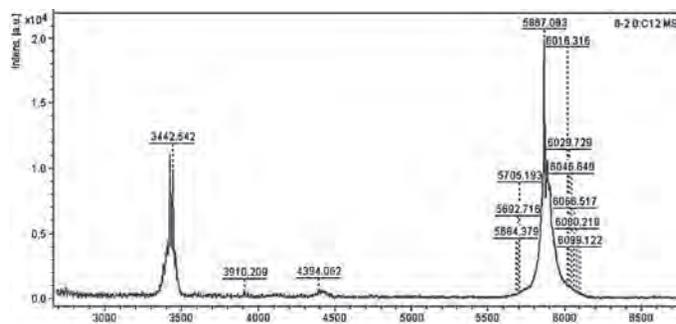


Рис. 3. Данные масс-спектрологии методом MALDI-TOF в процессе выделения АМВ *B. subtilis* П19 после экстракции этанолом.

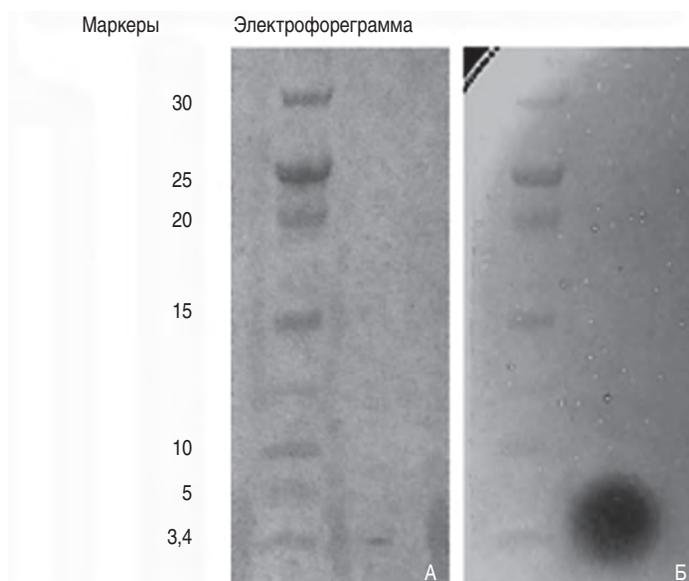


Рис. 4. Гель-электрофорез АМВ *B. subtilis* П19 в системе Tris-tricine SDS-PAGE (18%) с последующим биотестированием гелевой пластины на *L. monocytogenes* 766, позволяющим определить молекулярную массу активной фракции. Использовали пептидные маркеры PageRuler™ Low Range, кДа; а – ПААГ с BS после окраски Coomassie brilliant blue G250.

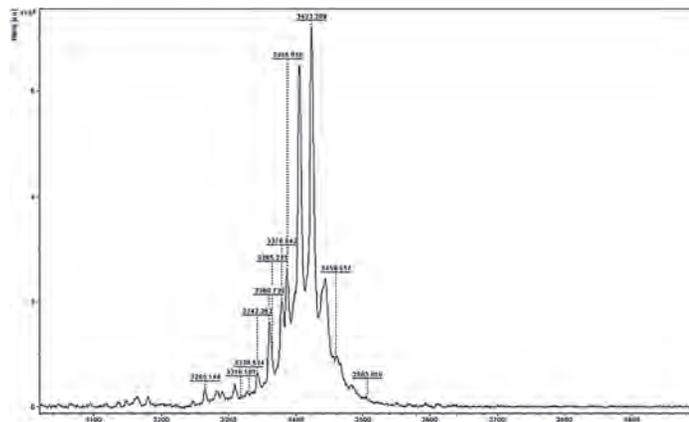


Рис. 5. Результат масс-спектрологии методом MALDI-TOF образца пептида, выделенного из АМВ после обработки н-бутанолом, демонстрирующий наличие пика в 3,4 кДа, который соответствует субтилизину А.

ме позволило выявить лишь один активный пептид с молекулярной массой 3,4 кДа (рис. 4).

Выделение активной фракции. Для получения целевого вещества из смеси пептидов 2 мл водной взвеси АМВ в стеклянном флаконе на 20 мл с активностью 6400 АЕ/мл развели до 10 мл, перемешивали 5 мин. Во флакон вносили 2,5 мл н-бутанола, в течение 20 мин гомогенизировали на вортексе и затем центрифугировали (4000 об./мин) 30 мин. Образующий органический слой собирали пипеткой и высушивали в стеклянной чашке при 70°C. Образовавшейся желтый преципитат ресуспендировали в 2 мл 50%-го диметилсульфоксида ((CH₃)₂SO) и подвергали хроматографической очистке на концентрирующем патроне ДИАПАК С-18 («Биохиммак», Россия). Элюирование начинали с 20% ацетонитрила (Ацн) в течение 5 мин, затем увеличивали до 50% Ацн в течение 20 мин и в конце снижали до 20% Ацн в течение 5 мин.

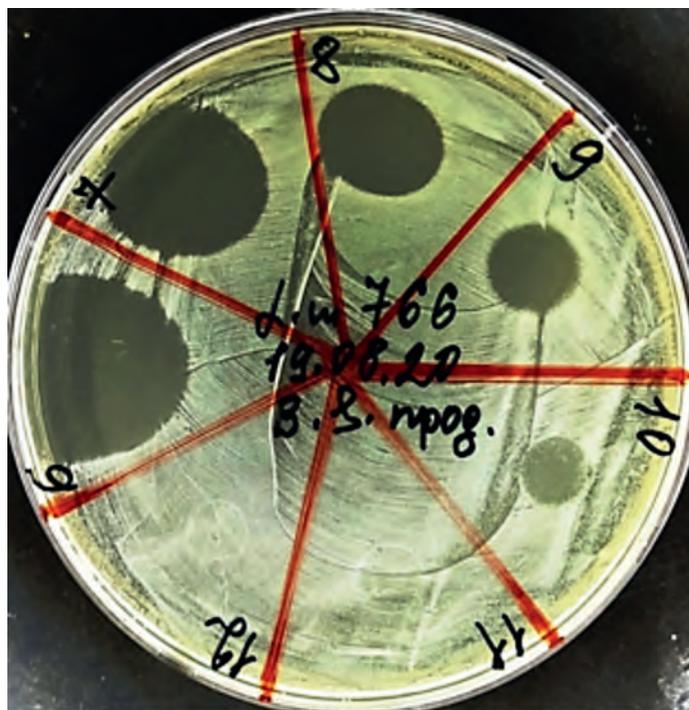


Рис. 6. Чашки с результатами определения титра антимикробной активности пробы очищенного бактериоцина *B. subtilis* П19, составляющей 102 400 АЕ/мл.

Таблица 4. Оценка активности бактериоцина *B. subtilis* П19 на некоторые микроорганизмы

Штаммы микроорганизмов	Наличие или отсутствие активности
<i>Bacillus alvei</i> ИПМ 1555	++++
<i>B. anthracis</i> 71/12	++++
<i>B. anthracis</i> СТИ 1	++++
<i>B. cereus</i> 164	++++
<i>B. cereus</i> 1070	++++
<i>B. megaterium</i> 321	++++
<i>B. thuringiensis</i> 1373	++++
<i>B. thuringiensis</i> 214	++++
<i>L. monocytogenes</i> 766	++++
<i>L. monocytogenes</i> BB1	++++
<i>L. ivanovi</i> 20751T	++++
<i>M. luteus</i> 59	++++
<i>M. caseolyticus</i> 38	++++
<i>S. aureus</i> 93R	+++
<i>S. aureus</i> (15 штаммов из птиц)	++ (на 7 штаммов)
<i>E. coli</i> R3	-
<i>E. coli</i> M17	±
<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> 68	-

Диаметры зон подавления роста бактерий от 10 мкл пробы: (+) – 3–5 мм; (++) – 6–8 мм; (+++) – 8–10 мм; (++++) – >10 мм; (±) – неясный результат; (-) – отсутствие результата.

Получаемый на выходе продукт представляет собой по данным MALDI-TOF (рис. 5) пептид с молекулярной массой 4,3 кДа, как у субтилозина А [23, 30], с активностью 25600 АЕ/мл против *L. monocytogenes* (рис. 6).

Изучение свойств выделенного бактериоцина. Бактериоцин *B. subtilis* П19, как следует из данных табл. 4, проявлял активность в отношении всех бактерий родов

Таблица 5. Физико-химические свойства грубого бактериоцина *B. subtilis* П19

Факторы	Значения	Активность, АЕ/мл		Потеря активности, %
		Исходная	Конечная	
рН	1,5–2,0	6400	3200	50
	2,5–3,5		3200–6400	25
	6,0–8,0		6400	0
	9,0–10,0		6400	0
	11,0–12,0		1600	75
Кипячение	10 мин	6400	6400	0
	30 мин		3200	50
Сухожаровой нагрев в течение 20 мин	при 70–80°C	6400	6400	0
	при 90–100°C		6400	0
	при 110°C		1600–3200	62
Обработка Панзинорм* форте 20000 (ЛС– 001355) при 37°C (1:1)	1,0 ч	6400	800	87,5
	2,0 ч		200	96,9
	3,0 ч		<100	>98,4

(*) Фермент убивали нагревом пробы до 90°C в течение 10 мин.

Bacillus, *Listeria*, *Micrococcus luteus* и некоторых штаммов *S. aureus*. В то же время на грамотрицательные микроорганизмы он не действует, что характерно для всех бактериоцинов группы лантибиотиков [14, 15].

Из данных табл. 5 видно, что бактериоцин *B. subtilis* П-19 выдерживает кипячение (10 мин), сухожаровой нагрев (+105°C, 20 мин), но разрушается в условиях, имитирующих физиолого-биохимические параметры процесса пищеварения человека и животных.

Определение наличия генов, ответственных за синтез бактериоцинов.

Кластер генов, ответственных за синтез субтилина *B. subtilis* (*spaB*, *spaT*, *spaC*, *subtilin* (*spaS*), *spaI*, *spaF*, *spaE*, *spaG*, *spaR*, *spaK* и *YvaN* (GenBank: U09819.1)), не обнаружен. Результаты предварительных исследований подтверждают наличие в штамме *B. subtilis* П19 кластера генов *sbo-alb* (локус BSU_37350), ответственных за продукцию субтилозина А. Данный кластер состоит из генов *sboAalbABCDEFG*, организованных в 7 кб оперон [30, 31].

Заключение

Бактериоцины считаются потенциальной альтернативой традиционным антибиотикам, и в мире они уже используются в качестве естественных консервантов для пищевой и фармацевтической индустрии. Они представлены низкомолекулярными пептидами, которые синтезируются на рибосомах бактерий и обладают способностью убивать чувствительные к ним микробы по механизму образования пор в мембранах.

Антагонистически активный штамм П19, изолированный нами в 2019 г. из растительной массы пассифлоры, на основе биохимических (API-50В, Biomerieux), масс-спектроскопических (Maldi Biotyper) и филогенетических (16S rRNA gene sequencing) тестов был идентифицирован как *B. subtilis*. Синтезируемое им в условиях глубинного культивирования АМВ выделяется из супернатанта КЖ следующим образом. КЖ закисляют до рН 2,5 и разделяют центрифугированием, осадок клеточной массы ресуспендируют в небольшом объеме воды с восстановлением рН (7,0) и обработкой ее этанолом (1:1). После этого смесь разделяют центрифугированием, супернатант упаривают, преципитат растворяют в фосфатном буфере. В результате масс-спектрологии (MALDI TOF-MS) показано присутствие в полученной смеси двух веществ с молекулярной массой 3,4 и 5,9 кДа.

С помощью методов электрофореза проб и последующего биотестирования полиакриламидной гелевой пластины показано, что антимикробной активностью обладает лишь пептид с молекулярной массой 3,4 кДа. Был отработан способ выделения активного вещества из смеси пептидов и определена его удельная активность. Так, молекулярная масса этого пептида была как у субтилозина А – одного из 6 бактериоцинов сенной палочки [18–21], тогда как активность составила 102400 АЕ/мл. Пептид переносит кипячение, перепады рН в широком диапазоне (2–10 ед.), но разрушается протеолитическими ферментами, что свойственно лантибиотикам – группе бактериоцинов класса I. Он активен в отношении таких групп патогенных бактерий, как *B. anthracis*, *B. cereus*, *S. aureus* и *L. monocytogenes*.

Найденный продуцент и синтезируемый им бактериоцин является еще одним из природных источников пополнения номенклатуры антимикробных веществ – альтернативы антибиотикам [32].

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rospotrebнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Благодарности

Авторы благодарны техническому персоналу, лаборантам отдела биологических технологий и отдела коллекционных культур за обслуживание лабораторного оборудования, обеспечение материалами и средами для этого исследования.

Gratitude

The authors are grateful to the technical staff of the Department of Biological Technologies and the Department of Collection Cultures for maintaining laboratory equipment, providing materials and media for this study.

Литература

- Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 2005 May;56(4):845-57. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
- Giessen TW, Marahiel MA. Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Lett.* 2012 Jul 16;586(15):2065-75. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.017
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1-3):39-85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 1976 Sep;40(3):722-56. DOI: 10.1128/br.40.3.722-756.1976
- Dischinger J, Basi Chipalu S, Bierbaum G. Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. *Int J Med Microbiol.* 2014 Jan;304(1):51-62. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.09.003
- Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 2002 May-Jun;84(5-6):577-92. DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01414-1
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013 Feb;11(2):95-105. DOI: 10.1038/nrmicro2937
- Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and its functionally valuable products – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(6):641-58. DOI: 10.1080/10408398.2011.553752
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014 May 26;5:241. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241
- Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:117-37. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1-3):39-85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
- Singh PK, Chittipurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S. Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. *PLoS One.* 2012;7(3):e31498. DOI: 10.1371/journal.pone.0031498
- Spieß T, Korn SM, Kötter P, Entian KD. Autoinduction Specificities of the Lantibiotics Subtilin and Nisin. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Nov;81(22):7914-23. DOI: 10.1128/AEM.02392-15
- Parisot J, Carey S, Breukink E, Chan WC, Narbad A, Bonev B. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):612-8. DOI: 10.1128/AAC.00836-07
- Сидорова ТМ, Асатурова АМ, Хомяк АИ. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов (обзор). *Сельскохозяйственная биология.* 2018;53(1):29-37. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus
- Патент РФ № 2553547. Штамм *Bacillus subtilis*, вырабатывающий пептид с противомикробной активностью, и способ ингибирования нежелательных микроорганизмов в материале с использованием штамма. Дата публикации: 20.10.2014 Бюл. №29. Опубликовано: 20.06.2015. Бюл. №17.
- Wang J, Zhang L, Teng K, Sun S, Sun Z, Zhong J. Cerecidins, novel lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Apr;80(8):2633-43. DOI: 10.1128/AEM.03751-13
- Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahn YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2015 Feb;61(2):93-103. DOI: 10.1139/cjm-2014-0613
- Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Jan;35(1):201-32. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
- Fickers P. Antibiotic compounds from so *Bacillus*: why are they amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 2012;8(1):38-43. DOI: 10.3844/ajbbsp.2012.38.43
- Barbosa J, Caetano T, Mendo S. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. *J Nat Prod.* 2015 Nov 25;78(11):2850-66. DOI: 10.1021/np500424y
- Phelan RW, Barret M, Cotter PD, O'Connor PM, Chen R, Morrissey JP, et al. Subtilomycin: a new lantibiotic from *Bacillus subtilis* strain MMA7 isolated from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Mar Drugs.* 2013 Jun 3;11(6):1878-98. DOI: 10.3390/md11061878
- Babasaki K, Takao T, Shimonishi Y, Kurahashi K. Subtilosin A. A new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem.* 1985 Sep;98(3):585-603. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135315
- Дармов ИВ, Чичерин ИЮ, Ердякова АС, Погорельский ИП, Лундовских ИА. Сравнительная оценка выживаемости микроорганизмов пробиотиков в составе коммерческих препаратов в условиях *in vitro*. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2011;9:96-101.
- Мальшева НВ, Науменко ОА, Фомина МВ. Биохимия пищеварения и питания: методические указания к лабораторному практикуму. Оренбург: ОГУ; 2011, 42 с.
- Платонов АЕ. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Изд-во РАМ; 2000.
- Роспотребнадзор. №418. Бутан-1-ол (бутиловый спирт). ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (рус.). Утверждены Поповой АЮ. М., 2018.
- Yang R, Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 1994;11:281-91.
- Похиленко ВД, Перельгин ВВ, Калмантаев ТА, Детушев КВ, Чукина ИА. Антимикробные свойства пептидной субстанции *Bacillus subtilis* ПСФ-19. *Интерактивная наука.* 2019;9(43):22-26. DOI: 10.21661/r-508120

30. Huang T, Geng H, Miyapuram VR, Sit CS, Vederas JC, Nakano MM. Isolation of a variant of subtilosin A with hemolytic activity. *J Bacteriol.* 2009 Sep;191(18):5690-6. DOI: 10.1128/JB.00541-09
31. Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P. Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J Bacteriol.* 1999 Dec;181(23):7346-55. DOI: 10.1128/JB.181.23.7346-7355.1999
32. Ефименко ТА. Бактериальные продуценты антибиотиков, активных в отношении микроорганизмов с лекарственной устойчивостью. Дисс. М., 2018, 140 с.

References

1. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 2005 May;56(4):845-57. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
2. Giessen TW, Marahiel MA. Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Lett.* 2012 Jul 16;586(15):2065-75. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.017
3. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1-3):39-85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
4. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 1976 Sep;40(3):722-56. DOI: 10.1128/br.40.3.722-756.1976
5. Dischinger J, Basi Chipalu S, Bierbaum G. Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. *Int J Med Microbiol.* 2014 Jan;304(1):51-62. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.09.003
6. Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 2002 May-Jun;84(5-6):577-92. DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01414-1
7. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013 Feb;11(2):95-105. DOI: 10.1038/nrmicro2937
8. Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and its functionally valuable products – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(6):641-58. DOI: 10.1080/10408398.2011.553752
9. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014 May 26;5:241. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241
10. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:117-37. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
11. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1-3):39-85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
12. Singh PK, Chittipurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S. Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. *PLoS One.* 2012;7(3):e31498. DOI: 10.1371/journal.pone.0031498
13. Spieß T, Korn SM, Kötter P, Entian KD. Autoinduction Specificities of the Lantibiotics Subtilin and Nisin. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Nov;81(22):7914-23. DOI: 10.1128/AEM.02392-15
14. Parisot J, Carey S, Breukink E, Chan WC, Narbad A, Bonev B. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):612-8. DOI: 10.1128/AAC.00836-07
15. Sidorova TM, Asaturova AM, Homyak AI. Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms. *Agricultural Biology.* 2018;53(1):29-37. DOI: 10.15389/agrobiol.2018.1.29rus (In Russian).
16. RF Patent No 2553547. A strain of *Bacillus subtilis* that produces a peptide with antimicrobial activity and a method for inhibiting undesirable microorganisms in the material using the strain. Date of publication: 20.10.2014 Byul. No 29. Published: 20.06.2015. Byul. No 17. (In Russian).
17. Wang J, Zhang L, Teng K, Sun S, Sun Z, Zhong J. Cerecidins, novel lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Apr;80(8):2633-43. DOI: 10.1128/AEM.03751-13
18. Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahn YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2015 Feb;61(2):93-103. DOI: 10.1139/cjm-2014-0613
19. Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Jan;35(1):201-32. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
20. Fickers P. Antibiotic compounds from so *Bacillus*: why are they amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 2012;8(1):38-43. DOI: 10.3844/ajbbsp.2012.38.43
21. Barbosa J, Caetano T, Mendo S. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. *J Nat Prod.* 2015 Nov 25;78(11):2850-66. DOI: 10.1021/np500424y
22. Phelan RW, Barret M, Cotter PD, O'Connor PM, Chen R, Morrissey JP, et al. Subtilomycin: a new lantibiotic from *Bacillus subtilis* strain MMA7 isolated from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Mar Drugs.* 2013 Jun 3;11(6):1878-98. DOI: 10.3390/md11061878
23. Babasaki K, Takao T, Shimonishi Y, Kurahashi K. Subtilosin A. A new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem.* 1985 Sep;98(3):585-603. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135315
24. Darmov IV, Chicherin IYu, Erdyakova AS, Pogorelsky IP, Lundovskikh IA. Comparative assessment of survival of probiotic microorganisms from commercial preparations under the conditions *in vitro*. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2011;9:96-101. (In Russian).
25. Malysheva NV, Naumenko OA, Fomina MV. Biochemistry of digestion and nutrition: guidelines for laboratory practice. Orenburg, 2011, 42 p. (In Russian).
26. Platonov AE. Statistical analysis in medicine and biology: terminology, logic, computer methods.. Moscow, 2000. (In Russian).
27. Rospotrebnadzor. No 418. Butane-1-ol (butyl alcohol). GN 2.2.5.3532-18 "Maximum permissible concentrations (MPC) of harmful substances in the air of the working area" (rus.). Approved by Popova AYU. Moscow, 2018. (In Russian).
28. Yang R, Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 1994;11:281-91.
29. Pokhilenko VD, Pereygin VV, Kalmantaev TA, Detushev KV, Chukina IA. Antimicrobial properties of the peptide substance *Bacillus subtilis* PSF-19. *Interactive Science.* 2019;9(43):22-26. DOI: 10.21661/i-508120 (In Russian).
30. Huang T, Geng H, Miyapuram VR, Sit CS, Vederas JC, Nakano MM. Isolation of a variant of subtilosin A with hemolytic activity. *J Bacteriol.* 2009 Sep;191(18):5690-6. DOI: 10.1128/JB.00541-09
31. Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P. Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J Bacteriol.* 1999 Dec;181(23):7346-55. DOI: 10.1128/JB.181.23.7346-7355.1999
32. Efimenko TA. Bacterial producers of antibiotics active against drug-resistant microorganisms. Diss. Moscow, 2018, 140 p. (In Russian).

Информация об авторах:

Калмантаев Тимур Ахмерович, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Детушев Константин Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Чукина Ирина Анатольевна, инженер отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Timur A. Kalmantaev, PhD (Biological Sciences), Researcher, Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Igor A. Dunaytsev, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher, Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Konstantin V. Detushev, Junior Researcher, Collection Cultures Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Angelina A. Kislichkina, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Collection Cultures Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tat'yana N. Mukhina, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Collection Cultures Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Irina A. Chukina, Engineer of Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Изменение климата и экстремальные погодные условия окажут комплексное воздействие на передачу болезней

Хорошо известно, что взаимодействия между патогенами и их хозяевами чувствительны к изменениям температуры. Предполагают, что изменение климата повысит не только средние температуры, но и температурные колебания, а также частоту и интенсивность экстремальных погодных явлений.

В настоящее время изучено влияние повышения средней температуры на характер взаимодействия хозяина и патогена, влияние переменных температурных режимов, таких как волны тепла, остается в значительной степени неизвестным.

Ученые изучили влияние различных температур на свойства организма-хозяина – небольшого ракообразного под названием *Daphnia magna* – и его известного кишечного паразита *Odospora colligata*. Передача паразита представляет собой классическую передачу через окружающую среду, аналогичную той, которая наблюдается при таких заболеваниях, как COVID-19 и холера.

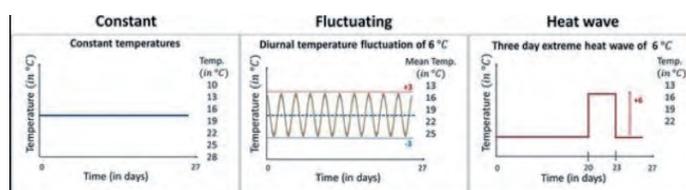
Исследовали, как организмы реагировали на три различных температурных режима: постоянная температура и два переменных режима с суточными колебаниями +/- 3 градуса по Цельсию и трехдневными волнами тепла на 6 градусов по Цельсию выше температуры окружающей среды. Затем измерялась продолжительность жизни ракообразных, плодовитость, инфекционный статус и количество спор паразитов в их кишечнике. Полученные данные обработали в статистической модели, чтобы сравнить влияние трех различных температурных режимов.

Установлено, что ежедневные колебания температуры снижают заразность и споровую нагрузку паразита по сравнению с теми, кто содержался при постоянной средней температуре. Однако, напротив, заразность паразитов после аномальной жары была почти такой же, как у паразитов, содержащихся при постоянной температуре.

Более того, количество спор в рачке-хозяине увеличилось после трехдневной «аномальной жары», когда фоновая постоянная температура составляла 16 градусов Цельсия, но это бремя уменьшалось при более высоких температурах. Это говорит о том, что эффекты изменения температуры различаются в зависимости от средней фоновой температуры и от того, близка ли она к оптимальной температуре для паразита.

Приспособленность хозяина и репродуктивный успех, как правило, снижались у ракообразных, подвергшихся воздействию спор паразита или при воздействии переменных температур. Разница между реакцией хозяина и патогена позволяет предположить, что при некоторых обстоятельствах паразиты были способны выдерживать внезапную смену тепла лучше, чем их хозяева.

Итак, изменение температуры сложным образом изменяет результат взаимодействия хозяина и патогена. Мало того, что изменение температуры по-разному влияет на разные черты хозяина и патогена, но также тип изменения и средняя температура, к которой оно применяется. Это означает, что изменение моделей колебаний климата, наложенное на сдвиги средних температур из-за глобального потепления, может иметь глубокие и непредвиденные последствия для динамики заболеваний.



Kunze C., et al.. Alternate patterns of temperature variation bring about very different disease outcomes at different mean temperatures // eLife. 2022. T. 11. C. e72861.

Разработка и оценка качества отечественной питательной среды для идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*

А.Ю.Иванова, О.В.Полосенко, А.П.Шепелин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Бактериологический метод, позволяющий выделить патоген из любого исследуемого объекта, характеризуется высокой специфичностью за счет внесения селективных добавок. Наиболее распространенный метод идентификации бактерий *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* основан на выделении чистой культуры на желточном агаре. Разработанная отечественная питательная среда – «Желточный агар с маннитом и феноловым красным, основа» (МYP-агар) – обладает хорошими селективными и дифференцирующими свойствами, может использоваться для выделения и подсчета *B. cereus* из пищевых продуктов, кормов для животных и объектов окружающей среды. Проведена специфическая оценка биологических свойств МYP-агара на тест-штаммах, показаны дифференцирующие свойства среды, позволяющие идентифицировать микроорганизмы *B. cereus*, *B. subtilis* уже на этапе первичного посева. МYP-агар дополнительно может использоваться для выявления и идентификации патогенных стафилококков.

Ключевые слова: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, стафилококки, бактериологический метод, МYP-агар, среда КМАФАнМ, среда TSA

Для цитирования: Иванова А.Ю., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Разработка и оценка качества отечественной питательной среды для идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*. Бактериология. 2022; 7(1): 18–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-18-24

Development and evaluation of the quality of the domestic nutrient medium for the identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*

A.Yu.Ivanova, O.V.Polosenko, A.P.Shepelin

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

A bacteriological method making it possible to isolate a pathogen from any object under study has been characterized by high specificity due to selective additives introduced. The most common method of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* identification relies upon the isolation of pure culture on egg yolk agar. The domestic egg yolk agar supplemented with mannitol and phenolic red (MYP Agar Base) possesses good selective and differentiating properties to be used for isolating and counting *B. cereus* bacilli in food, animal feed and environmental specimens. Biological properties of MYP agar against test strains were specifically assessed. Differentiating properties of the medium allowing the identification of *B. cereus* and *B. subtilis* microorganisms as early as at the initial plating have been demonstrated. MYP agar can be also used to detect and identify pathogenic staphylococci.

Key words: *B. cereus*, *B. subtilis*, staphylococci, bacteriological method, MYP-agar, NMAFAnM medium, TSA medium

For citation: Ivanova A.Yu., Polosenko O.V., Shepelin A.P. Development and evaluation of the quality of the domestic nutrient medium for the identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Bacteriology. 2022; 7(1): 18–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-18-24

Для корреспонденции:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 26
Телефон (4967) 31-2170
E-mail: polosenko@obolensk.org

Статья поступила 17.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Olga V. Polosenko, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher, Microbiological Research Unit, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 26 "Quarter A" territory, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2170
E-mail: polosenko@obolensk.org

The article was received 17.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

Микроорганизмы рода *Bacillus* могут быть возбудителями серьезных инфекционных заболеваний. В роду *Bacillus*, насчитывающем 263 вида, выделяют группу *Bacillus cereus sensu lato*, представленную тремя основными видами: *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. anthracis*. Это деление было признано к началу 1990-х гг., потому что каждый из видов проявлял различные фенотипические черты [1].

Бактерии *B. cereus* способны при определенных условиях вызывать у человека широкий спектр заболеваний, включающий пищевые токсикоинфекции, системные и местные гнойные инфекции. Впервые этиологическая роль *B. cereus* при пищевых отравлениях была изучена и описана Naugle в 1950 г. [2]. Начиная с 1951 г. накопились сообщения об острых желудочно-кишечных заболеваниях у человека, вызываемых *B. cereus* [3]. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), в США ежегодно регистрируется более 60 тыс. случаев заболеваний, вызванных *B. cereus*. Изучение роли *B. cereus* при пищевых отравлениях в нашей стране начато лишь в последние годы [4].

Основной причиной инфицирования человека является употребление в пищу недостаточно термически обработанных мясных и рыбных блюд, невымытых овощей, непастеризованного молока и некоторых других продуктов. Особенно быстро *B. cereus* размножается в измельченных продуктах (фарш, котлеты, колбаса, кремы). В сырье допускается не более 100 клеток в 1 г, в стерилизованных консервах присутствие *B. cereus* не допускается. Споры *B. cereus* термостойчивы и могут сохраняться в продукте не только при обычной кулинарной обработке, но даже и при стерилизации консервов. В связи с этим контроль *B. cereus* в ряде продуктов является обязательным санитарно-эпидемиологическим показателем, утвержденным в СанПиН 2.3.2.1078-01 [5].

Кроме инфекций, связанных с пищевым отравлением, *B. cereus* была выявлена при множестве других клинических состояний. Сообщалось о молниеносном сепсисе, менингите и абсцессах головного мозга, эндофтальмите, эндокардите, остеомиелите, кожной инфекции по типу газовой гангрены и т.д. В последние годы появились сведения о пневмониях, вызываемых *B. cereus*. Так, Hoffmaster A.R. et al. [6] сообщают о выделении из слюны и крови больного пневмонией человека штамма *B. cereus* G9241, имеющего плазмиду pBCX01, гомология которой с плазмидой pX01 *B. anthracis* составила 99,6%. При проведении диагностических тестов у полученного изолята было обнаружено сходство с сибиреязвенным микробом. Наблюдалась пневмония с летальными исходами, при которых выделяли штаммы *B. cereus*, продуцирующие токсин, подобный сибиреязвенному [1, 7, 8].

На поверхности плотных питательных сред, таких как мясопептонный агар (МПА), триптон-соевый агар (ТСА) и ряд других неселективных сред, колонии *B. cereus* крупные, плоские, распластанные, белого цвета. Рост этого микроорганизма на жидких питательных средах сопровождается помутнением бульона, образованием хлопьевидного осадка белого цвета (у 25–30% штаммов) и нежной пленки белого цвета на поверхности среды.

Первоначально, когда этот микроорганизм изучался главным образом как почвенный, для его выделения использовался обычный желточный или кровяной агар. В настоящее

время для его выделения рекомендуют использовать селективные среды: триптон-соевый полимиксиновый бульон (TSPB), среду Донован, среду Никодемуса, среду Моссея, желточный агар с полимиксином, пируватом, яичным желтком, маннитом и бромтимоловым синим (РЕМВА), солевой полимиксиновый агар с ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолий хлористый) и др. [4, 9].

Проведение широких исследований по изучению этиологической роли данного микроорганизма при пищевых отравлениях у человека потребовало разработки новых питательных сред, позволяющих выделять данный микроорганизм из сильно загрязненных микрофлорой объектов.

B. subtilis (сенная палочка) также является возбудителем порчи многих пищевых продуктов [8]. Широко распространена в окружающей среде. *B. subtilis* относится к транзитным (проходящим с кормовыми массами) просветным микроорганизмам, присутствует в фекалиях всех животных в больших количествах, так как в обычных условиях поступает с кормами.

Согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» *B. subtilis* не относится к патогенным для человека микроорганизмам, но может быть санитарно-гигиеническим показателем загрязнения микроорганизмами пищевых продуктов и может приводить к отравлениям при их употреблении [10].

В соответствии с требованиями промышленной стерильности консервированных пищевых продуктов, по микробиологическим показателям безопасности допускается содержание спорообразующих мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов группы *B. subtilis* не более 11 клеток в 1 г (см³) продукта [11].

Штаммы в составе пробиотических препаратов отбираются по выраженности антагонистических свойств к патогенной микрофлоре. Они продуцируют большое количество антибиотических и других веществ, подавляющих многие микроорганизмы. *B. subtilis* используют в промышленности при производстве антибиотиков класса полимиксины (с бактерицидным действием в отношении грамотрицательных бактерий). Имеют выраженные ферментативные свойства, улучшают переваримость корма. Являются представителями гнилостной микрофлоры за счет ярко выраженных протеолитических свойств [12].

Описаны случаи эндокардитов, энцефаломиелитов, пневмоний и даже летальных исходов, обусловленных *B. subtilis*. Исходя из этого следует, что близкородственные спорообразующие сапрофиты могут быть потенциально опасными для человека [13, 14].

Бактерии неприхотливы и хорошо растут на простом агаре, в бульоне, на средах с растительными остатками и синтетических питательных средах для гетеротрофов. На плотных питательных средах образуются сухие, мелкие, морщинистые, бархатистые колонии с волнистым краем розового, серого цвета или полностью прозрачные. На поверхности жидких сред после инкубации появляется тонкая пленка с беловатым налетом, а на дно пробирки выпадает осадок. Помимо разложения белков эти бактерии способны разлагать пектиновые вещества, полисахариды растительных тканей, сбраживать углеводы.

С учетом этиологической роли *B. cereus* и *B. subtilis* при пищевых отравлениях у человека возникает научный и практический интерес к бактериям этого вида. Кроме того, представители родов *Bacillus*, в том числе *B. cereus* и *B. subtilis*, относятся к микроорганизмам, способным вызывать заболевания или способным осуществлять либо опосредовать передачу генов антибиотикорезистентности [11].

Все вышеизложенное привлекает к данным микроорганизмам внимание все большего и большего числа исследователей. А выделение и идентификация *B. cereus* и *B. subtilis* при санитарно-микробиологическом анализе различных объектов является актуальной задачей для обеспечения максимально возможной их безопасности.

Наиболее распространенный (классический) метод идентификации этого вида бацилл основан на выделении чистой культуры, но внутриродовое разграничение бацилл *B. cereus* и *B. subtilis* на традиционных неселективных питательных средах затруднено. В связи с этим вопрос о разработке достоверного культурального метода выделения и идентификации бактерий *B. cereus* от *B. subtilis* остается актуальным. Достоверно типировать *B. subtilis* от *B. cereus* можно, руководствуясь описанием морфологии колоний и отсутствием лецитиназной активности, с использованием желточных питательных сред [4].

Желточные селективные питательные среды выпускаются ведущими зарубежными производителями: MYP agar Mossel – Агар желточный с маннитом, полимиксином и феноловым красным (Merck) – для определения, учета и выделения *B. cereus*; MYP Agar Base – Основа желточного агара с полимиксином (HiMedia) – для выделения и идентификации клинически значимых бацилл и стафилококков; *Bacillus Cereus Selective Agar Base* – основа селективного агара для *B. cereus* (Pronadisa) – для выделения и подсчета *B. cereus* из продуктов питания.

Для выявления и подсчета наиболее вероятного числа жизнеспособных презумптивных *B. cereus* по стандартам ГОСТ ISO 21871-2013 российские методики предполагают использование селективной среды – агара с маннитом, яичным желтком и полимиксином (MYP) лабораторного приготовления [9].

В отечественной практике питательная среда в сухом виде не производится, поэтому существует необходимость ее разработки в рамках программы импортозамещения, одной из главных задач которой является придание отечественной экономике хороших конкурентоспособных свойств.

Цель исследования: провести качественную оценку питательной среды (MYP-агар) для выделения и дифференциации *B. cereus*, *B. subtilis*, разработанной на основе отечественных белковых компонентов в сравнении с неселективными питательными средами.

Материалы и методы

Питательные среды. В исследовании использовали среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ: питательную среду для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда КМАФАнМ) ТУ 20.59.52-260-78095326-2017, МПА ТУ 20.59.52-286-78095326-2018, ТСА ТУ 9385-254-78095326-

2016. Испытуемой средой служил желточный агар с маннитом и феноловым красным, основа (MYP-агар) ТУ 20.59.52-351-78095326-2021. В качестве контроля использовали агар с маннитом, яичным желтком и полимиксином (MYP-агар) лабораторного приготовления согласно ГОСТ ISO 21871-2013 [9]. В питательные среды (MYP-агар) вносили селективную добавку (полимиксин В) производства BioFroxx.

Эмульсию яичного желтка готовили по общепринятой методике, включающей приготовление желточной взвеси, полученной из желтка, асептически выделенного из яйца и внесенного в изотонический раствор хлорида натрия [9].

Тест-штаммы. Для биологического контроля питательных сред были использованы тест-штаммы микроорганизмов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболонск»: *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400, *Staphylococcus aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P, *Escherichia coli* 168/59 (O111:K58), *Pseudomonas aeruginosa* 27/99. Все использованные штаммы микроорганизмов типичны по своим культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам.

Рост микроорганизмов на питательных средах оценивали количественным методом в соответствии с МУК 4.2.2316–08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [15]. Для этого исходные суспензии микроорганизмов для посева готовили в 0,9%-м растворе натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности СОС 42-28-85 (10 единиц мутности). Использовали рабочие разведения 10^{-5} – для целевых культур тест-штаммов *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 и *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400; для тест-штамма *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P – разведение 10^{-6} . Для оценки результатов при интерпретации ингибирующих свойств испытуемой среды нецелевых тест-штаммов *E. coli* 168/59 (O111:K58) и *P. aeruginosa* 27/99 использовали разведения 10^{-4} .

Результаты и обсуждение

Спорообразующие бациллы неприхотливы к питательным средам. Тем не менее отсутствуют единые критерии типизации патогенных бацилл и возникают трудности при их дифференциации с использованием неселективных питательных сред. На рис. 1, 2 наглядно продемонстрирован рост тест-штаммов *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 и *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 на классических неселективных агаризованных питательных средах.

При росте на питательной среде КМАФАнМ через 24 ч инкубации при температуре 33°C рост тест-штамма *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 наблюдался в виде плоских, мелкобугристых, слегка вогнутых, матовых с волнистыми краями колоний диаметром 3,0–6,0 мм (рис. 1а). На МПА рост тест-штамма *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 – в виде крупных, расплывчатых, серовато-беловатых колоний с неровными краями, диаметром 3,0–6,0 мм (рис. 1б). Колонии *B. cereus* на ТСА через 24 ч представляли собой плоские, расплывчатые, с волнистыми краями колонии диаметром 3,0–5,0 мм (рис. 1в).

Тест-штамм *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 при росте на питательной среде КМАФАнМ в течение 24 ч при температуре 33°C образовывал сухие колонии кремового цвета, па-

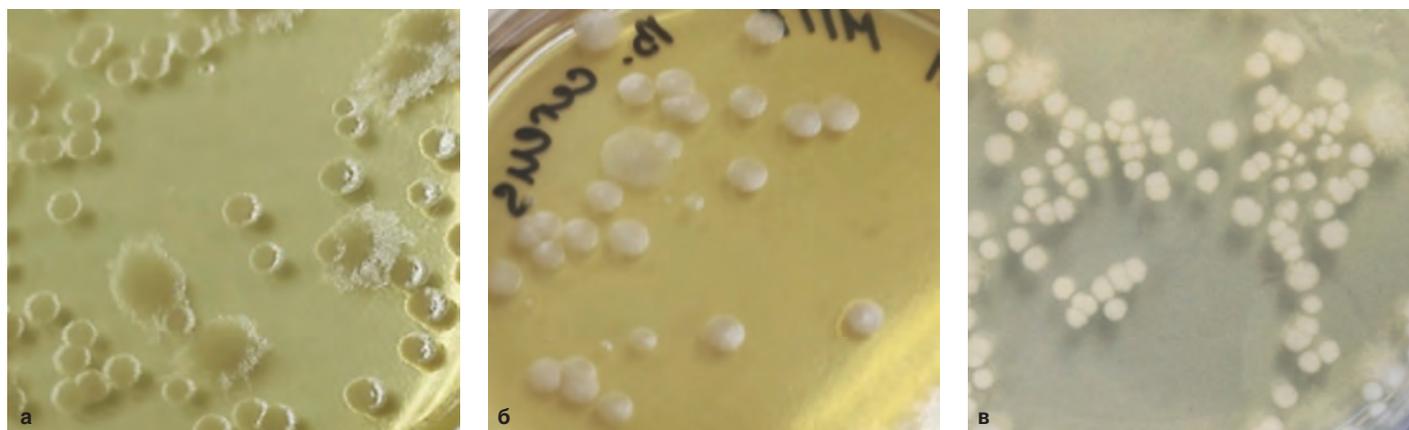


Рис. 1. Рост тест-штамма *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 на питательных средах: а – среда КМАФАНМ, б – МПА, в – TSA.

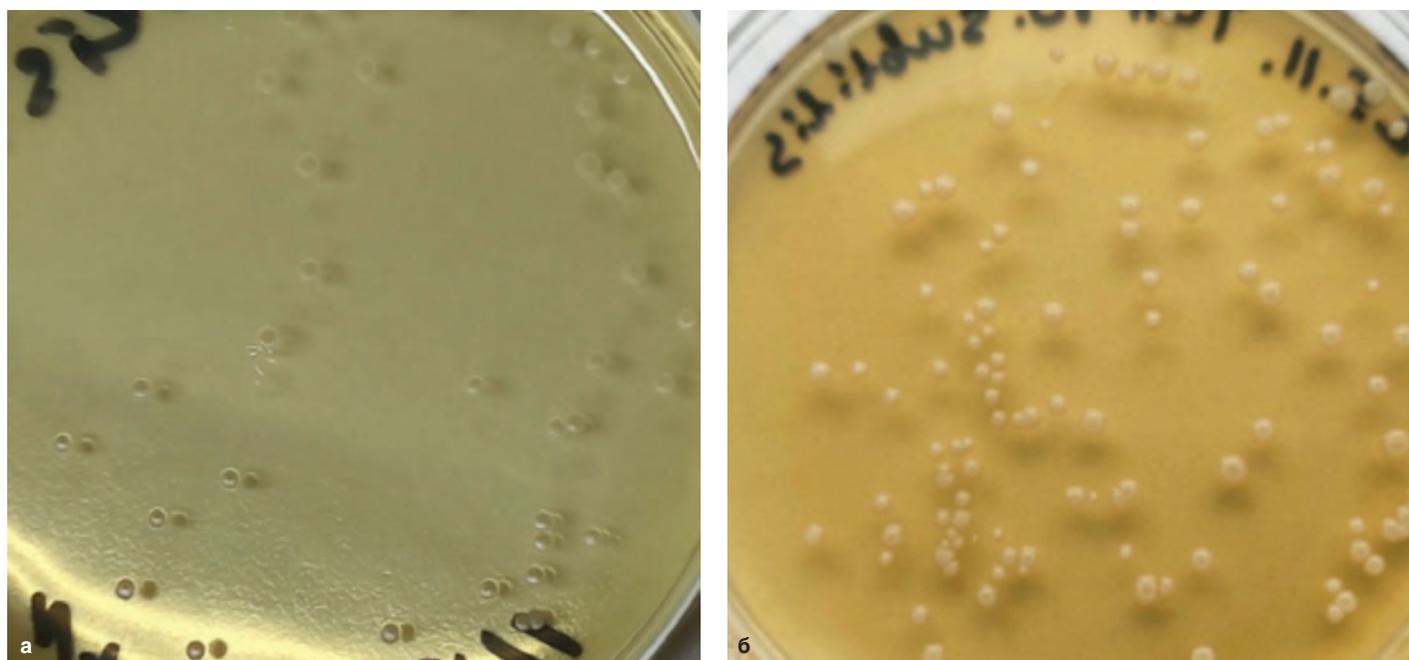


Рис. 2. Рост тест-штамма *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 на питательных средах: а – среда КМАФАНМ, б – TSA.

стообразной консистенции с неровными краями, диаметром 2,0 мм (рис. 2а), на TSA – кремового цвета колонии с неровными изрезанными краями, диаметром 2,0–3,0 мм (рис. 2б).

Такие питательные среды не обладают селективными свойствами, в связи с чем дифференциация бактерий рода *Bacillus* затруднена и необходимо использовать питательные среды, имеющие в составе индикаторные красители, сахара и селективные добавки.

Поэтому МУР-агар явился средой, позволяющей определить фенотипические свойства выросших культур микроорганизмов и правильно их идентифицировать.

Бактериологическими лабораториями широко применяются питательные среды, в качестве белковых компонентов которых используются ферментативные гидролизаты мяса, рыбы, рыбной муки, мясокостной муки, казеина, желатина и т.д. При разработке МУР-агара проводились исследования по определению возможности использования качественных белковых основ. Наиболее доступным отечественным белковым компонентом при разработке МУР-агара в настоящее время является панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ) и панкреатический гидролизат казеина (ПГК) [16].

ПГК и ПГРМ имеют сопоставимую степень расщепления белка и полный набор незаменимых аминокислот, поэтому обеспечивают в питательных средах биологическую потребность достаточно широкого круга микроорганизмов в азотистом питании.

Оптимизация состава МУР-агара была проведена по основным факторам: содержанию белковой основы и витаминной добавки (дрожжевой экстракт). Концентрации остальных компонентов оставались на одном уровне с контрольной питательной средой лабораторного изготовления – средой сравнения, так как считались оптимальными. Изменение соотношения этих компонентов приводило к неспецифической опознавательной реакции.

Таким образом, состав МУР-агара, г/л: ПГРМ/ПГК – 10,0; дрожжевой экстракт – 1,00; маннит – 10,0; натрия хлорид – 10,0; феноловый красный – 0,025; агар бактериологический – 14,0. Состав селективной добавки (СД): полимиксина В сульфат – 0,012.

pH 7,0–7,4. Величина pH, определенная по МУК 4.2.2316-08, является условной величиной, которая соответствует значению pH готовой среды и может незначительно менять-

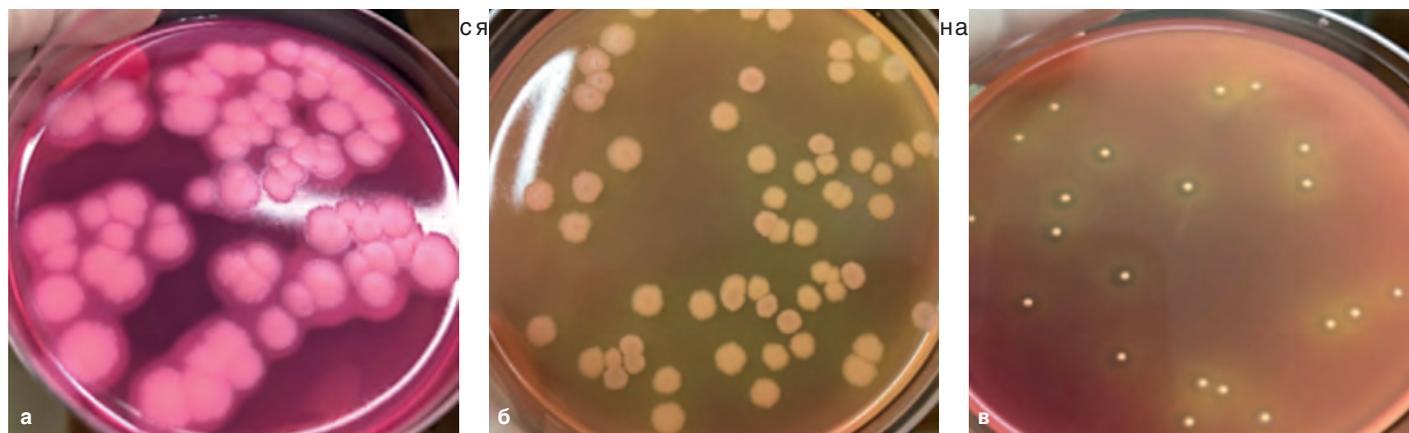


Рис. 3. Рост тест-штаммов на МYP-агаре ФБУН ГНЦ ПМБ: а – *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, б – *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400, в – *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P.

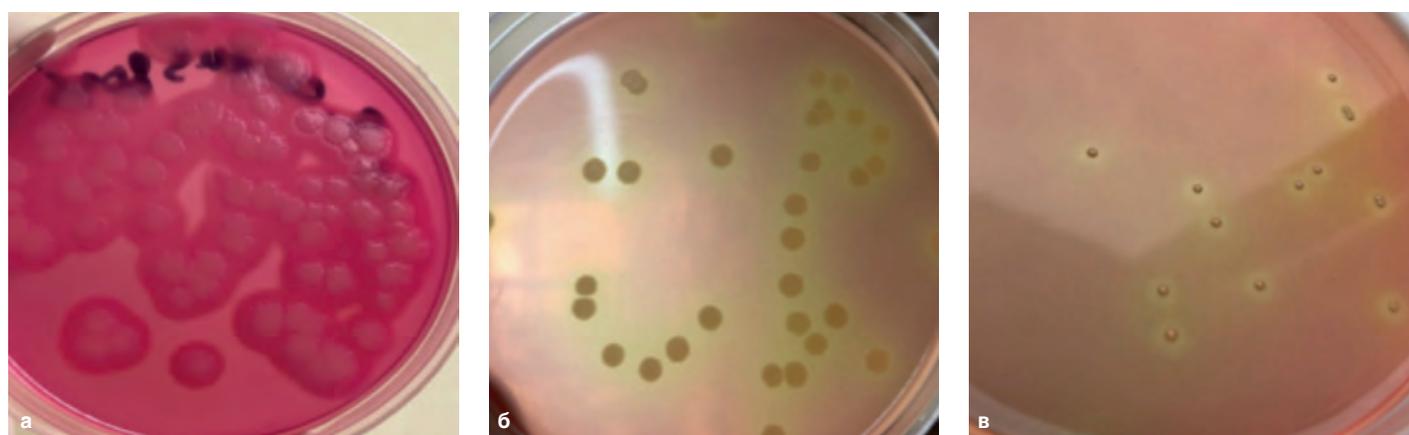


Рис. 4. Рост тест-штаммов на контрольной среде МYP-агар: а – *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, б – *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400, в – *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P.

после стерилизации. Пределы значения pH, указанные выше, учитывают отклонения pH после стерилизации среды.

Биологические показатели МYP-агара определяли после внесения в основу желточной эмульсии и селективной добавки.

Питательная среда разработана с учетом биохимических особенностей *B. cereus*. *B. cereus* – маннит-отрицательны. Присутствие маннита в среде позволяет дифференцировать сопутствующую маннит-положительную микробную флору, идентифицируемую по изменению цвета индикатора фенолового красного на желтый.

Для определения лецитиназной активности *B. cereus* в состав питательной среды МYP-агар включена желточная эмульсия. Нерастворимые продукты распада яичного желтка аккумулируются вокруг колоний *B. cereus*, образуя белый преципитат. Лецитиназная активность проявляется очень быстро, поэтому колонии *B. cereus* могут быть обнаружены раньше других видов, устойчивых к полимиксину.

На рис. 3а, 4а представлен рост тест-штамма *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 на питательной среде МYP-агар и контрольной в виде шершавых, плоских, матовых колоний розового цвета, окруженных кольцом плотного преципитата, диаметром 3,0–6,0 мм.

Бактерии *B. subtilis* в отличие от *B. cereus* ферментируют маннит и не проявляют лецитиназную активность, поэтому

среде образуют матовые желтоватого цвета колонии диаметром 2,0–3,0 мм с диффузным пожелтением среды (рис. 3б, 4б).

Рост тест-штаммов *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 из разведений 10^{-5} и *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P из разведения 10^{-6} регистрировался при температуре 33°C через 24 ч.

Некоторые ведущие производители используют МYP Agar Base для выделения и идентификации не только клинически значимых бацилл, но и стафилококков. Стафилококки хотя и относятся к легко распознаваемым и обнаруживаемым микроорганизмам и не требуют сложных диагностических приемов в микробиологической практике клинических лабораторий, однако часто возникают определенные трудности установления их потенциальной патогенности. Присутствие желтка в таких питательных средах дает возможность визуально наблюдать лецитовителлазную реакцию. Стафилококки, продуцирующие лецитиназу, разлагают яичный желток, в результате чего вокруг выросших колоний формируются характерные прозрачные и матовые зоны. Проявление лецитиназной активности является одним из важных показателей патогенности стафилококков [17].

На МYP-агаре маннит-положительный и продуцирующий лецитиназу *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P образует круглые блестящие колонии желтого цвета с зоной лецитиназной активности диаметром 1,0–2,0 мм (рис. 3в, 4в).

B. cereus устойчивы к концентрациям полимиксина, который подавляет рост таких грамотрицательных бактерий, как *E. coli* и *P. aeruginosa*. Внесение полимиксина необходимо, если предполагается высокое содержание сопутствующих микроорганизмов в материале проб.

При посеве тест-штаммов *E. coli* 168/59 (O111:K58), *P. aeruginosa* 27/99 из разведения 10^{-4} при температуре 32°C через 24 ч на МҮР-агарах рост полностью отсутствовал.

Таким образом, достоверным методом идентификации *B. cereus* и *B. subtilis* является бактериологический метод с использованием питательных сред. МҮР-агар используется для выделения и изучения культурально-морфологических признаков бактерий *B. cereus* и *B. subtilis* и характеризуется высокой специфичностью за счет внесения селективной добавки. Среда обеспечивает внутривидовую дифференциацию *B. cereus* и *B. subtilis* по способности ферментировать маннит и проявлять лецитиназную активность.

Заключение

Сухая отечественная питательная среда МҮР-агар может быть использована для выделения и визуальной идентификации бактерий рода *Bacillus* из пищевых продуктов, кормов для животных, фармацевтических и косметических продуктов, воды, объектов окружающей и производственной среды. Полимиксин в составе среды ингибирует рост большинства энтеробактерий, тем самым облегчая выделение *B. cereus*, делает среду селективной и позволяет выделить патоген на этапе первичного посева.

Внедрение в практику современной отечественной питательной среды МҮР-агар для санитарных исследований позволит отказаться от закупки дорогостоящих импортных препаратов. А создание и внедрение в бактериологическую практику питательной среды нового поколения, обладающей информативностью, производительностью и низкой стоимостью повысит надежность бактериологических исследований.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография. Под ред. профессора Поповой АЮ и академика РАН Дятлова ИА. М.: Династия; 2020, 448 с.
2. Hauge S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. Journal of Applied Bacteriology. 1955;18:591-5.

3. Ахундова КА. Значение *B. cereus* в патологии человека. Журнал микробиологии. 1967;10:129-32.
4. Васильев ДА, Калдыркаев АИ, Феоктистова НА, Алёшкин АВ. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Научное издание. Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А.Столыпина; 2013, 98 с.
5. СанПин 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов». Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06-06-2001.
6. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
7. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. FEMS Microbiol Rev. 2005 Apr;29(2):303-29. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.005
8. Мудрецова-Висс КА, Масленникова ЕВ, Дедюхина ВП. Основы микробиологии. Учебник. М.: Издательство ИНФРА-М; 2014, 354 с.
9. ГОСТ ISO 21871-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод обнаружения и подсчета наиболее вероятного числа *Bacillus cereus*. Введ.01-07-2014. М.: Стандартиформ; 2013, 15 с.
10. СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28-01-2021.
11. Технический регламент Таможенного союза. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011. Введ. 2013-07-01. М.: РосТест; 2013. 242 с.
12. Данилевская НВ. Фармакологические аспекты применения пробиотиков. Ветеринария. 2005;11:6-10.
13. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2010 Apr;23(2):382-98. DOI: 10.1128/CMR.00073-09
14. Ефимочкина НР. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2010, 28 с.
15. МУК 4.2.2316-08 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. Введ. 2008-01-18. М.: Федеральный центр гигиены и эпиднадзора Роспотребнадзора; 2008, 67 с.
16. Шепелин АП. Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред. Бактериология. 2016;1(1):42-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47
17. Полосенко ОВ, Шепелин АП, Ажержмачева НИ, Абаев ИВ. Клинические испытания новых питательных сред для выделения стафилококков. Клиническая лабораторная диагностика. 2021;66(2):115-21. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121

References

1. Microbiological quality control of food products. Edited by Popova AYU, Dyatlov IA. Moscow: "Dinastiya" Publ.; 2020, 448 p. (In Russian).
2. Hauge S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. Journal of Applied Bacteriology. 1955;18:591-5.
3. Akhundova KA. The significance of *B. cereus* in human pathology. Zhurnal mikrobiologii. 1967;10:129-32. (In Russian).
4. Vasil'ev DA, Kaldyrkaev AI, Feoktistova NA, Aleshkin AV. Identification of *Bacillus cereus* bacteria based on their phenotypic characteristics. Ulyanovsk, 2013, 98 p. (In Russian).
5. SanPIN 2.3.2.1078-01 "Hygienic requirements for the safety and nutritional value of food products". Approved. Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation 06-06-2001. (In Russian).

6. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
7. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 Apr;29(2):303-29. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.005
8. Mudretsova-Viss KA, Maslennikova EV, Dedyukhina VP. Fundamentals of microbiology. Moscow: "INFRA-M" Publ.; 2014, 354 p. (In Russian).
9. GOST ISO 21871-2013 Microbiology of food and animal feed. Method of detecting and counting the most probable number of *Bacillus cereus*. Introduction. 01-07-2014. Moscow: "Standartinform" Publ.; 2013, 15 p. (In Russian).
10. SanPiN 3.3686-21. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. Approved. Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation 28-01-2021. (In Russian).
11. Technical Regulations of the Customs Union. About food safety: TR CU 021/2011. Introduction. 2013-07-01. Moscow: "RosTest" Publ.; 2013.242 p. (In Russian).
12. Danilevskaya NV. Farmakologicheskie aspekty primeneniya probiotikov. *Veterinariya*. 2005;11:6-10. (In Russian).
13. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Apr;23(2):382-98. DOI: 10.1128/CMR.00073-09
14. Efimochkina NR. New bacterial pathogens in food products: experimental substantiation and development of a control system using methods of microbiological and molecular genetic analysis. Diss. Moscow, 2010, 28 p. (In Russian).
15. MUK 4.2.2316-08 Methods of control. Biological and microbiological factors. Methods of control of bacteriological nutrient media. Methodical instructions. Intr. 2008-01-18. Moscow: Federal Center for Hygiene and Surveillance, Rospotrebnadzor; 2008, 67 p. (In Russian).
16. Shepelin AP. Nutrient media: current status & trends in design, production and application. *Bacteriology*. 2016;1(1):42-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47 (In Russian).
17. Polosenko OV, Shepelin AP, Azhermacheva NI, Abaev IV. Clinical trials of new culture media for staphylococcus isolation. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2021;66(2):115-21. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121 (In Russian).

Информация об авторах:

Иванова Анастасия Юрьевна, стажер-исследователь сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

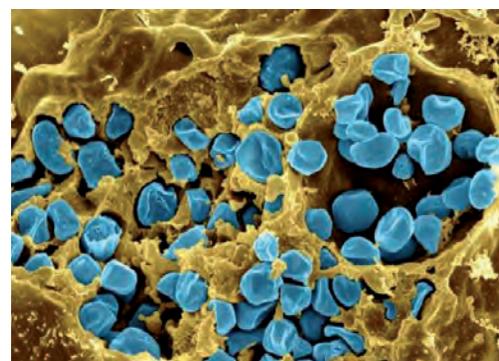
Anastasia Yu. Ivanova, Intern Researcher, Microbiological Research Unit, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Возбудитель туляремии остается вирулентным в течение нескольких месяцев в холодной воде

Francisella tularensis, возбудитель туляремии, может вызывать сезонные вспышки острого лихорадочного заболевания у людей, пик которого приходится на конец лета – осень. Механизмы его устойчивости в окружающей среде между вспышками плохо изучены. Одна из гипотез состоит в том, что *F. tularensis* образует биопленки в водной среде. В исследовании использовали два вирулентных штамма дикого типа: FSC200 (*F. tularensis* subsp. *Holarctica*) и Schu S4 (*F. tularensis* subsp. *Tularensis*) и три контрольных штамма: аттенуированный штамм живой вакцины (LVS; *F. tularensis* subsp. *Holarctica*), Schu S4 мутант DwbtI, который, как документально подтверждено, образует биопленки, и штамм с низкой вирулентностью U112 близкородственного вида *Francisella novicida*. Штаммы инкубировали в микрокосмах с соевым раствором (0,9% NaCl) в течение 24 нед. при 4°C и при 20°C, после чего измеряли жизнеспособность и образование биопленок. Эти температуры были выбраны для приблизительных зимних и летних температур пресной воды в Скандинавии соответственно. U112 и Schu S4 DwbtI образовывали биопленки, а штаммы *F. tularensis* FSC200 и Schu S4 и LVS – нет. Все штаммы показали более длительную жизнеспособность при 4°C по сравнению с 20°C. Штаммы U112 и FSC200 продемонстрировали замечательную долгосрочную устойчивость при 4°C, с только 1- и 2-кратным логарифмическим сокращением, соответственно, жизнеспособных клеток через 24 нед. Штамм Schu S4 показал более низкую выживаемость, не давая никаких жизнеспособных клеток к 20-й неделе. Через 24 нед. клетки штамма FSC200, но не Schu S4, все еще были полностью вирулентными у мышей. Эти результаты демонстрируют независимое от биопленки долгосрочное выживание патогенных *F. tularensis* subsp. *holarctica* в условиях, имитирующих перезимовку в водной среде.



Golovliov I, Bäckman S, Granberg M, et al.

Long-Term Survival of Virulent Tularemia Pathogens outside a Host in Conditions That Mimic Natural Aquatic Environments. *Appl Environ Microbiol*. 2021 Feb 26;87(6):e02713-20. DOI: 10.1128/AEM.02713-20

Состояние кишечной микробиоты у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких

О.Г.Комиссарова, В.А.Шорохова, С.Н.Андреевская, Р.Ю.Абдуллаев

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Российская Федерация

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния микробиоты кишечника у больных туберкулезом легких. Изучено состояние кишечной микробиоты у 71 больного впервые выявленным и у 76 пациентов с ранее леченным туберкулезом легких. Было установлено, что у больных впервые выявленным туберкулезом легких частота встречаемости чистого бифидо-энтеротипа была значимо ниже по сравнению со здоровыми. При этом в отличие от здоровых у них обнаруживались дисбалансные энтеротипы. У больных ранее леченным туберкулезом легких нарушение кишечной микрофлоры было более глубоким, частота встречаемости чистого бифидо-энтеротипа была ниже как по сравнению со здоровыми, так и с больными впервые выявленным туберкулезом легких. При этом спектр различных энтеротипов у этой группы больных был шире, а частота их встречаемости больше. Нарушение состояния кишечной микробиоты I степени чаще наблюдалось у больных впервые выявленным, а II степени – ранее леченным туберкулезом легких.

Ключевые слова: впервые выявленный туберкулез, ранее леченный туберкулез, кишечная микробиота, энтеротипы, дисбактериоз

Для цитирования: Комиссарова О.Г., Шорохова В.А., Андреевская С.Н., Абдуллаев Р.Ю. Состояние кишечной микробиоты у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких. Бактериология. 2022; 7(1): 25–31. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-25-31

Gut microbiota state in newly diagnosed and previously treated patients with pulmonary tuberculosis before the treatment

O.G.Komissarova, V.A.Shorokhova, S.N.Andreevskaya, R.Yu.Abdullaev

Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

The purpose of this study was to study the state of the intestinal microbiota in patients with pulmonary tuberculosis. The state of the intestinal microbiota was studied in 71 patients with newly diagnosed and 76 patients with previously treated pulmonary tuberculosis. It was found that in newly diagnosed patients with pulmonary tuberculosis, the incidence of pure bifido-enterotype was significantly lower compared to healthy ones. At the same time, unlike healthy ones, they had unbalanced enterotypes. In patients with previously treated pulmonary tuberculosis, the violation of the intestinal microflora was deeper, the frequency of occurrence of pure bifido-enterotype was lower both in comparison with healthy and with patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. At the same time, the spectrum of various enterotypes in this group of patients was wider, and the frequency of their occurrence was greater. Violation of the state of the intestinal microbiota of the I degree was more often observed in patients with newly diagnosed, and II degree – previously treated pulmonary tuberculosis.

Key words: newly diagnosed tuberculosis, previously treated tuberculosis, intestinal microbiota, enterotypes, dysbiosis

For citation: Komissarova O.G., Shorokhova V.A., Andreevskaya S.N., Abdullaev R.Yu. Gut microbiota state in newly diagnosed and previously treated patients with pulmonary tuberculosis before the treatment. Bacteriology. 2022; 7(1): 25–31. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-25-31

Для корреспонденции:

Шорохова Виолетта Андреевна, младший научный сотрудник отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Адрес: 107564, Москва, Яузская аллея, 2
Телефон: (499) 785-3023
E-mail: shelakova.07@inbox.ru

Статья поступила 25.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Violetta A. Shorokhova, Junior Researcher, Department of Pathomorphology, Cell Biology and Biochemistry, FSBSI Central Research Institute of Tuberculosis

Address: 2 Yauzskaya alley, Moscow, 107564, Russian Federation
Phone: (499) 785-3023
E-mail: shelakova.07@inbox.ru

The article was received 25.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

В настоящее время туберкулез (ТБ) продолжает оставаться одной из наиболее распространенных инфекций в мире и представляет огромную опасность для здоровья населения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2020 г. показатель заболеваемости ТБ в мире составлял 9,9 млн новых случаев заболевания в год, среди получавших лечение пациентов было зарегистрировано 482 683 случая с устойчивостью микобактерий туберкулеза (МБТ) к рифампицину (РУ) и множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) МБТ [1]. Одной из причин распространенности МЛУ/ШЛУ (широкой лекарственной устойчивости) штаммов МБТ является низкая эффективность лечения больных лекарственно-устойчивым ТБ. По данным ВОЗ, в 2020 г. эффективность лечения этой категории пациентов в мире в среднем составила 59% [1], в РФ – 55% [2].

Одной из причин низкой эффективности лечения больных ТБ является нарушение состояния кишечной микробиоты в рамках системного воспалительного ответа [3, 4]. Микробиота человека представляет собой совокупность множества видов микроорганизмов, которые в норме и при патологии сосуществуют с ним, участвуют в физиологических и патофизиологических реакциях, метаболизме лекарственных веществ и гормонов [5, 6].

Кишечная микробиота обладает огромным метаболическим потенциалом и осуществляет синтетическую, пищеварительную, дезинтоксикационную, антиканцерогенную функции, участвует в регуляции газового состава кишечника, водно-солевого баланса, в создании колонизационной резистентности, регуляции иммунного ответа, развитии и нормальном функционировании как адаптивного, так и врожденного иммунитета [7–12].

Кишечная микробиологическая система является одной из основных гомеостатических систем организма, дисбаланс которой становится патогенетическим звеном многих соматических и инфекционных заболеваний. По данным ряда авторов, дисбиоз кишечника вызывает нарушения иммунной защиты от туберкулезной инфекции, что приводит к повышенной восприимчивости ТБ или рецидивированию туберкулезного процесса [3, 4].

В литературе имеются единичные и противоречивые работы, посвященные изучению состояния кишечной микробиоты у больных ТБ [13–15]. Так, по данным Hu Y. et al. (2019), у больных ТБ наблюдалось снижение разнообразия микробиома кишечника [14]. Однако эти изменения были минимальными и относились к роду *Bacteroides*. В процессе лечения противотуберкулезными препаратами (ПТП), напротив, многие виды из рода *Bacteroides* увеличились, а популяция *Clostridiales* значительно сократилась. Luo M. et al., (2017) при исследовании состава микробиома кишечника у больных с рецидивами ТБ наблюдали снижение уровня родов *Bacteroidetes*, *Lachnospira* и *Prevotella*, а также увеличение количества рода *Actinobacteria* и *Proteobacteria* по сравнению со здоровыми [15]. Вместе с тем детальное изучение широкого спектра маркеров кишечной микробиоты и фило типов у впервые выявленных и ранее леченных больных до сих пор не проводилось. Между тем изучение состояния кишечной микробиоты у впервые выявленных больных поможет выявить наличие взаимосвязи между ТБ легких и состоянием кишечной микробиоты. Оценка состояния ки-

шечной микробиоты у ранее леченных больных поможет ответить на вопрос, насколько предыдущее лечение изменило состав кишечной микробиоты. Эти соображения послужили основанием проведения настоящего исследования.

Цель исследования – изучение состояния микробиоты кишечника у больных впервые выявленным и ранее леченым туберкулезом легких.

Материалы и методы

В исследование были включены 147 пациентов с ТБ легких. В исследование включались пациенты от 18 лет и старше с подтвержденным диагнозом ТБ легких. Из исследования исключались пациенты, получавшие антибиотикотерапию в течение последнего месяца, имеющие аутоиммунные и онкологические заболевания, вирусные гепатиты, наркоманию и алкоголизм, а также беременные женщины.

Больные были разделены на две группы в зависимости от характера процесса: в 1-ю группу включены пациенты с впервые выявленным ТБ органов дыхания (выявленные менее чем за 1 мес. до включения в исследование), не получавшие антибиотикотерапию в течение последнего месяца (71 пациент, 48,3%), во 2-ю – ранее леченные больные с установленным диагнозом ТБ органов дыхания, получавшие химиотерапию более 1 мес. до включения в исследование (76 пациентов, 51,7%). В группе больных впервые выявленным ТБ чуть более половины (52,1%) составили мужчины, женщин было 47,9%. Среди ранее леченных пациентов более половины больных (55,4%) составили женщины, мужчин было 44,6%. Более половины больных в обеих группах составили лица от 18 до 40 лет (среди впервые выявленных больных – 70,4%, среди ранее леченных – 56,5%). Инфильтративный ТБ несколько чаще выявлялся среди больных впервые выявленным ТБ легких по сравнению с больными ранее леченым ТБ легких (соответственно 47,9 и 35,5%; $p = 0,08$). Диссеминированный ТБ значительно чаще диагностировался у впервые выявленных больных (соответственно 11,3 и 1,3%; $p = 0,004$). Фиброзно-кавернозный (соответственно 25,1 и 5,6%; $p = 0,0001$) и цирротический ТБ (соответственно 11,8 и 1,4%; $p = 0,002$) значительно чаще выявлялись у ранее леченных больных. В группе впервые выявленных больных распад в легочной ткани наблюдался в 49,3% случаев, в группе ранее леченных больных – в 71,0% ($p = 0,002$). Бактериовыделение, обнаруженное методом люминесцентной микроскопии и посева мокроты, наблюдалось у более половины больных в обеих группах, но более часто в группе пациентов с ранее леченым ТБ легких (соответственно у впервые выявленных больных – 54,9%, у ранее леченных пациентов – 71,0%; $p = 0,027$). В группе больных впервые выявленным ТБ легких преобладали больные со сохраненной лекарственной чувствительностью МБТ (соответственно 78,6 и 2,6%; $p = 0,00...$), а в группе пациентов с ранее леченым ТБ большинство составили больные с МЛУ/ШЛУ МБТ (соответственно 79,0 и 21,1%). Слабо выраженная туберкулезная интоксикация значительно чаще выявлялась при впервые выявленном ТБ легких (соответственно 78,3 и 58,9%; $p = 0,0037$), а умеренно выраженная – при ранее леченом ТБ легких (соответственно 4,3 и 28,6%; $p = 0,000003$). Резко выраженная туберкулезная интоксика-

ция наблюдалась у 17,4% больных впервые выявленным ТБ легких и у 12,5% – ранее леченным ТБ легких. Таким образом, как видно из приведенных данных, больные впервые выявленным и ранее леченным ТБ легких по клинико-рентгенологическим и лабораторным показателям значительно различаются, что дает основание изучать состояние кишечной микробиоты отдельно в каждой группе пациентов.

В условиях стационара всем больным проводили детальное клиническое, лабораторное обследование с использованием инструментальных методов. Состояние кишечной микробиоты исследовали с применением бактериологического метода исследования нативных фекалий [16] до начала лечения. Культивируемые сообщества кишечной микробиоты оценивали по общему количеству микроорганизмов и по относительному распределению фило типов в паттерне каждого пациента. Были изучены следующие фило типы: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, клостридии, *Escherichia coli* типичные, *E. coli* лактозонегативные, *E. coli* гемолитические, другие условно-патогенные энтеробактерии, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., неферментирующие бактерии, *Staphylococcus aureus*, другие стафилококки, *Enterococcus*, грибы рода *Candida*, другая грибковая флора и микрофлора. Энтеротип пациентов при поступлении определяли по преобладающему в сообществе микроорганизму: если количество микроорганизмов определенного фило типа составляло $\geq 75\%$ от всего состава, то название энтеротипу давали по этому фило типу, если несколько фило типов в равном соотношении суммарно составляли $\geq 75\%$, то название энтеротипа складывалось из названий 2 и более фило типов.

Также определяли степень нарушения кишечной микрофлоры согласно отраслевому стандарту «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника», утвержденному приказом Минздрава России от 9 июня 2003 г. №231. Нарушение состояния кишечной микробиоты I степени диагностировали при снижении содержания бифидобактерий до 10^8 – 10^7 КОЕ/г, лактобактерий – до 10^6 – 10^5 КОЕ/г, типичных эшерихий – до 10^6 – 10^5 КОЕ/г, при возможном повышении содержания типичных эшерихий до 10^9 – 10^{10} КОЕ/г. Нарушение состояния кишечной микробиоты II степени определяли при снижении содержания бифидобактерий до $\leq 10^7$ КОЕ/г, лактобактерий до $\leq 10^5$ КОЕ/г, повышении содержания гемолитических эшерихий или других условно-патогенных бактерий до концентрации 10^5 – 10^7 КОЕ/г или обнаружении ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов в концентрации 10^4 – 10^5 КОЕ/г. Для III степени нарушения кишечной микробиоты было характерно снижение содержания бифидобактерий до $\leq 10^7$ КОЕ/г, лактобактерий – до $\leq 10^5$ КОЕ/г, обнаружение ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов в концентрации $\geq 10^6$ – 10^7 КОЕ/г.

Все исследования проводились в соответствии с требованиями биомедицинской этики согласно Женевской конвенции о правах человека (1997) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000) на основании разрешения локального этического комитета ФГБНУ «ЦНИИТ» с соблюдением федерального закона о персональных данных с поправкой от 30.12.2017. У всех пациентов получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel 2013. Для каждой группы вычисляли среднее арифметическое (M) и ошибку среднего (m). Проверку гипотезы о равенства средневыборочных величин при их нормальном распределении проводили, используя t -критерий Стьюдента или критерий суммы рангов Уилкоксона, Манна–Уитни для количественных данных с распределением, отличным от нормального. При сравнении качественных (категориальных) переменных в группах использовали χ^2 Пирсона. Статистическую значимость демонстрировало значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При исследовании паттернов фило типов кишечной микробиоты у здоровых добровольцев было установлено, что суммарное количество выделенных микроорганизмов составило 10^9 – 10^{10} КОЕ/г, причем во всех случаях доминировали *Bifidobacterium*, которые составляли от 82,6 до 99,8% от всего микробного сообщества. В меньшем количестве (не более 9,0%) были представлены другие представители микробиоты: *Lactobacillus*, *Enterococcus* и типичные *E. coli*. Следовательно, все здоровые добровольцы имели бифидо-энтеротип (доминирование *Bifidobacterium*).

В группе впервые выявленных больных при поступлении в стационар структура микробной популяции кишечника отличалась от контрольной группы.

Чистый бифидо-энтеротип, характерный для здоровых лиц, был выявлен у 44 (62,0%) больных, дисбалансные энтеротипы, содержащие сниженное число бифидобактерий (от 30 до 50%) в комбинации с другими представителями нормофлоры, встречались у 15 (21,1%) пациентов. Оставшиеся 12 (16,9%) энтеротипов содержали $< 10,0\%$ бифидобактерий, доминирующими были другие представители нормальной микрофлоры: лактобактерии, энтерококки и типичные *E. coli*.

В группе ранее леченных больных энтеротипы еще сильнее отличались от группы здоровых контролей: чистый бифидо-энтеротип встречался у 31 (40,8%), дисбалансные энтеротипы со сниженным числом бифидобактерий в комбинации с другими представителями микробиоты – у 22 (28,9%) больных. У 18 (23,7%) пациентов энтеротипы содержали $< 10,0\%$ бифидобактерий и доминирующими были другие представители нормальной микрофлоры. У 5 (6,6%) больных в число доминирующих фило типов входили условно-патогенные бактерии.

На рис. 1, 2 представлена частота встречаемости отдельных энтеротипов у больных впервые выявленным и ранее леченным ТБ легких. Как видно из приведенных данных, у больных ранее леченным ТБ по сравнению с впервые выявленным спектр встречающихся энтеротипов значительно шире. Некоторые энтеротипы встречаются только у пациентов с ранее леченным ТБ легких. В этой группе пациентов чаще встречаются комбинированные энтеротипы.

Далее оценили частоту встречаемости различных колебаний в отдельных показателях кишечной микробиоты у больных ТБ легких (табл. 1).

Как видно из представленных данных, у большинства больных впервые выявленным ТБ легких до начала лечения выявлялись изменения в составе кишечной микробиоты.

Таблица 1. Частота встречаемости различных колебаний в показателях кишечной микробиоты у больных туберкулезом легких, %

Показатели и единицы измерения	Впервые выявленные (71)						Ранее леченные (76)					
	норма		снижение		повышение		норма		снижение		повышение	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
	1	2	3	4	5	6						
<i>Bifidobacterium</i> , lg KOE/1г	21	29,6	50	70,4	-	-	17	22,4	59	77,6	-	-
<i>Lactobacillus</i> , lg KOE/1г	20	28,2	51	71,8	-	-	29	38,2	17	61,8	-	-
<i>Clostridium</i> , lg KOE/1г	71	100	-	-	-	-	76	100	-	-	-	-
<i>E. coli</i> типичные, lg KOE/1г	27	38	44	62	-	-	38	50	38	50	-	-
<i>E. coli</i> лактозонегативные, lg KOE/1г	69	97,2	-	-	2	2,8	69	90,8	-	-	7	9,2
<i>E. coli</i> гемолитические, lg KOE/1г	71	100	-	-	-	-	75	98,7	-	-	1	1,3
<i>Klebsiella</i> spp., lg KOE/1г	70	98,6	-	-	1	1,4	71	93,4	-	-	5	6,6
<i>Enterobacter</i> spp., lg KOE/1г	70	98,6	-	-	1	1,4	75	98,7	-	-	1	1,3
<i>S. aureus</i> , lg KOE/1г	71	100	-	-	-	-	74	97,4	-	-	2	2,6
<i>Enterococcus</i> , lg KOE/1г	54	76,1	17	23,9	-	-	60	78,9	16	21,1	-	-
Грибы рода <i>Candida</i> , lg KOE/1г	60	84,5	-	-	11	15,5	64	84,2	-	-	12	15,8

Так, снижение уровня *Bifidobacterium* наблюдалось у 70,4%, *Lactobacillus* – у 71,8% и *E. coli* типичных – у 62,0% больных. Снижение количества энтерококков выявляли в 23,9% случаев. У ряда больных этой категории наблюдалось повышение уровня патологической микрофлоры. В частности, у 15,5% пациентов выявлялось повышение уровня грибов рода *Candida*. Повышенное содержание *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp. наблюдалось по 1,4% больных соответственно. Колебания в показателях других маркеров кишечной микробиоты (клубридий, *E. coli* гемолитических, других условно-патогенных энтеробактерий, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., неферментирующих бактерий, золотистого стафилококка, других стафилококков, другой грибковой флоры и другой микрофлоры) не выявлялись.

Близкие данные были получены при исследовании состоянии кишечной микробиоты у ранее леченных больных при поступлении в клинику (табл. 1). Частота снижения уровня *Bifidobacterium* выявлялась в 77,6%, *Lactobacillus* – в 61,8% и *E. coli* типичных – в 50,0% случаев. Снижение уровня *Enterococcus* выявляли в 21,1% случаев. Повышенное содержание *Klebsiella* sp. наблюдалось у 6,6%, *Enterobacter* sp. – у 1,3%, грибов рода *Candida* – у 15,8% пациентов. Вместе с тем только у больных данной категории выявлялись такие представители патологической микрофлоры кишечника, как *E. coli* лактозонегативные (в 9,2% случаях), *E. coli* гемолитические (в 1,3% случаев) и *S. aureus* (в 2,6% случаев).

Далее мы проанализировали изменения средних значений маркеров кишечной микробиоты у больных впервые выявленным и ранее леченным ТБ легких (табл. 2).

Количество *Bifidobacterium* как у больных впервые выявленным, так и ранее леченным ТБ легких было значимо ниже по сравнению со здоровыми. Вместе с тем наиболее выраженное снижение уровня *Bifidobacterium* наблюдали у пациентов с ранее леченным ТБ легких. Близкие данные были получены при анализе *Lactobacillus*. Их концентрация была снижена в обеих группах больных (у впервые выявленных и ранее леченных), но более существенно у пациентов с

ранее леченным ТБ. Содержание *E. coli* типичных было снижено как у впервые выявленных, так и у ранее леченных больных. При этом достоверные различия по уровню *E. coli* типичных между сравниваемыми группами отсутствовали. Количество *Enterococcus* имело тенденцию к снижению в обеих группах пациентов по сравнению со здоровыми, но

Таблица 2. Изменения средних значений маркеров кишечной микробиоты у больных впервые выявленным и ранее леченным туберкулезом легких, $M \pm t$

Показатели и единицы изменения	Здоровые $n = 27$	Ранее леченные $n = 76$	
		Впервые выявленные $n = 71$	Ранее леченные $n = 76$
		1	2
<i>Bifidobacterium</i> , lg KOE/1г	9,50 ± 0,09	7,95 ± 0,09*	7,22 ± 0,14*
Min–max	9–10	6–9	6–9
<i>Lactobacillus</i> , lg KOE/1г	7,5 ± 0,1	6,33 ± 0,12*	5,89 ± 0,14*
Min–max	7–8	5–8	5–8
<i>Clostridium</i> , lg KOE/1г	2,5 ± 0,2	2,94 ± 0,02*	3,0 ± 0,1*
Min–max	0–5	2–3	2–3
<i>E. coli</i> типичные, lg KOE/1г	7,5 ± 0,1	6,52 ± 0,10*	6,48 ± 0,13*
Min–max	7–8	5–8	5–8
<i>E. coli</i> лактозонегативные, lg KOE/1г	2,5 ± 0,2	0,18 ± 0,12*	0,63 ± 0,23*
Min–max	0–5	0–7	0–7
<i>E. coli</i> гемолитические, lg KOE/1г	0 ± 0	0 ± 0	0,09 ± 0,09
Min–max			
<i>Klebsiella</i> sp., lg KOE/1г	2,0 ± 0,2	0,08 ± 0,08*	0,72 ± 0,24*
Min–max	0–4	0–6	0–6
<i>Enterobacter</i> sp., lg KOE/1г	2,0 ± 0,2	0,08 ± 0,08*	0 ± 0
Min–max	0–4	0–6	
<i>S. aureus</i> , lg KOE/1г	0 ± 0	0 ± 0	0,22 ± 0,13*
Min–max			0–7
<i>Enterococcus</i> , lg KOE/1г	6,5 ± 0,2	6,21 ± 0,17	6,06 ± 0,14
Min–max	5–8	3–8	4–8
Грибы рода <i>Candida</i> , lg KOE/1г	2,0 ± 0,2	1,40 ± 0,25	1,94 ± 0,22
Min–max	0–4	0–6	0–6

*различия с нормой достоверны.

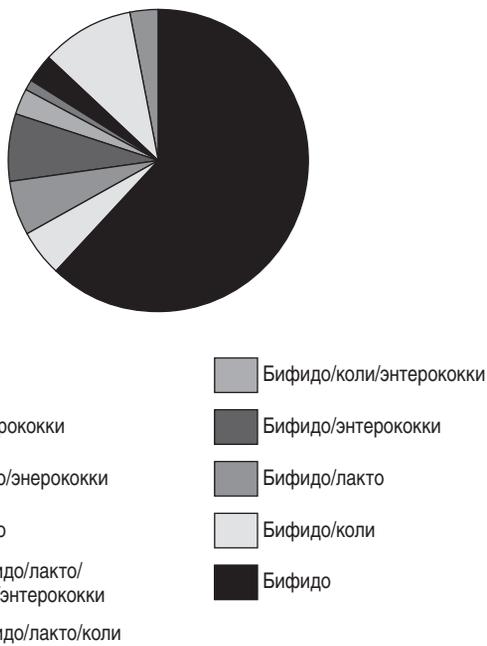


Рис. 1. Энтеротипы кишечной микробиоты по преобладающему представителю микробного сообщества у больных впервые выявленным туберкулезом легких.

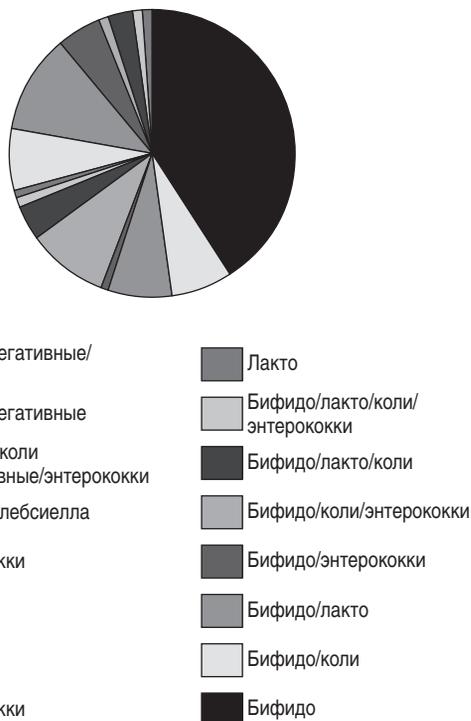


Рис. 2. Энтеротипы кишечной микробиоты по преобладающему представителю микробного сообщества у больных ранее леченным туберкулезом легких.

более значительно у больных ранее леченным ТБ легких. Амплитуда индивидуальных колебаний показателей нормальной микрофлоры кишечника у больных впервые выявленным и ранее леченным ТБ не отличалась.

Среди представителей патологической микрофлоры отмечалось некоторое повышение уровня *Clostridium* в обеих группах больных. При этом различия между группами были не значимыми. *Klebsiella* spp. обнаруживалась как у больных

Степень	Впервые выявленные		Ранее леченные	
	абс.	%	абс.	%
Здоровые	4	5,6	-	-
1	51	71,8	34	44,7
2	10	14,1	33	43,4
3	6	8,5	9	11,9

впервые выявленным, так и ранее леченым ТБ. При этом уровень не превышал нормальные значения, но тем не менее у больных ранее леченным ТБ их количество было значительно выше по сравнению с впервые выявленными больными. *E. coli* гемолитические и *S. aureus* выявлялись только в группе больных ранее леченным ТБ легких. Грибы рода *Candida* обнаруживались в обеих группах пациентов. Их уровень не превышал нормальные значения, но у больных ранее леченным ТБ их количество в 1,4 раза было больше по сравнению с больными впервые выявленным ТБ.

При анализе результатов исследования степени нарушения кишечной микробиоты было установлено, что до начала лечения у большинства (71,8%) больных впервые выявленным ТБ легких наблюдалась I степень нарушения состояния кишечной микробиоты. В группе с ранее леченным ТБ количество таких больных составило 44,7% ($p = 0,0001$) (табл. 3).

Нарушение кишечной микробиоты II степени у впервые выявленных больных наблюдалось в 14,1% случаев, а у больных ранее леченным ТБ легких – в 43,4% ($p = 0,000008$). Частота встречаемости нарушений кишечной микробиоты III степени в сравниваемых группах значимо не различалась.

Заключение

Таким образом, анализ результатов исследования состояния кишечной микробиоты показал, что для здоровых добровольцев было характерно наличие чистого бифидо-энтеротипа. У больных впервые выявленным ТБ легких частота встречаемости чистого бифидо-энтеротипа была значимо ниже по сравнению со здоровыми добровольцами. При этом у них в отличие от здоровых обнаруживались дисбалансные энтеротипы. Эти данные свидетельствовали о том, что сама туберкулезная интоксикация нарушает состояние кишечной микробиоты, поскольку эти пациенты ранее не получали противотуберкулезные препараты. У больных ранее леченным ТБ легких нарушение кишечной микробиоты усугублялось, частота встречаемости чистого бифидо-энтеротипа была ниже как по сравнению со здоровыми, так и с больными впервые выявленным ТБ легких. При этом спектр различных энтеротипов у этой группы больных был шире, а частота их встречаемости больше. Вероятно, в нарушении состояния кишечной микробиоты у ранее леченных больных ТБ легких, кроме туберкулезной интоксикации, важную роль играет прием противотуберкулезных препаратов на предыдущем этапе лечения.

Анализ абсолютных значений отдельных маркеров кишечной микробиоты показал, что наиболее выраженное снижение уровня представителей кишечной нормофлоры (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*) выявлялось у

больных ранее леченным ТБ. Кроме того, такие патологические представители кишечной микробиоты, как *E. coli* гемолитические и *S. aureus*, наблюдались только у больных ранее леченным ТБ легких.

Анализ результатов исследования степени нарушений кишечной микробиоты показал, что нарушение кишечной микробиоты I степени чаще наблюдалось у больных впервые выявленным ТБ, у ранее леченных больных наблюдалось нарушение состояния кишечной микробиоты II степени.

Информация о финансировании

Работа проведена при финансовой поддержке ФГБНУ «ЦНИИТ» и подготовлена в ходе выполнения научно-исследовательской работы по теме №FURE-2022-0016 «Лабораторные аспекты проявления системного воспалительного ответа у больных туберкулезом и различными заболеваниями бронхолегочной системы, перенесших инфекцию, вызванную SARS-CoV-2».

Financial support

The work was carried out with the financial support of the Federal State Budget Scientific Institution «Central TB Research Institute» and was prepared in the course of the research work on the topic No FURE-2022-0016 «Laboratory aspects of the manifestation of a systemic inflammatory response in patients with tuberculosis and various diseases of the bronchopulmonary system who had an infection caused by SARS-CoV-2».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. Нечаева ОБ, Сон ИМ, Гордина АВ, и др. Ресурсы и деятельность противотуберкулезных организаций Российской Федерации в 2019–2020 гг. (статистические материалы). М.: РИО ЦНИИОИЗ; 2021, 112 с.
3. Dumas A, Corral D, Colom A, Levillain F, Peixoto A, Hudrisier D, et al. The Host Microbiota Contributes to Early Protection Against Lung Colonization by *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol*. 2018 Nov 14;9:2656. DOI: 10.3389/fimmu.2018.0265
4. Eribo OA, du Plessis N, Ozturk M, Guler R, Walzl G, Chegou NN. The gut microbiome in tuberculosis susceptibility and treatment response: guilty or not guilty? *Cell Mol Life Sci*. 2020 Apr;77(8):1497-1509. DOI: 10.1007/s00018-019-03370-4
5. Кожевников АА, Раскина КВ, Мартынова ЕЮ, Тяхт АВ, Перфильев АВ, Драпкина ОМ, и др. Кишечная микробиота: современные представления о видовом составе, функциях и методах исследования. *PMЖ*. 2017;25(17):1244-7.
6. Никонов ЕЛ, Гуревич Г, Терентьев АЮ. Микробиота различных локусов организма. Под редакцией Никонова ЕЛ, Поповой ЕН. М.: Издательство Медиа Сфера; 2019, с. 58-89.
7. Кравчук ЕН, Неймарк АЕ, Гринева ЕН, Галагудза ММ. Регуляция метаболических процессов, опосредованная кишечной микрофлорой. *Сахарный диабет*. 2016;19(4):280-285. DOI: 10.14341/DM7704

8. Ардатская МД. Роль пищевых волокон в коррекции нарушений микробиоты и поддержании иммунитета. *PMЖ*. 2020;12:24-29.
9. Голошубина ВВ, Трухан ДИ, Багишева НВ. Нарушения кишечного микробиоценоза: актуальные аспекты терминологии, клиники, профилактики. *PMЖ*. 2020;12:17-22.
10. Schirmer M, Smeeckens SP, Vlamakis H, Jaeger M, Oosting M, Franzosa EA, et al. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):1125-1136.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.020
11. Schirmer M, Smeeckens SP, Vlamakis H, Jaeger M, Oosting M, Franzosa EA, et al. Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):1125-1136.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.020. Erratum in: *Cell*. 2016 Dec 15;167(7):1897. Erratum in: *Cell*. 2016 Dec 15;167(7):1897.
12. Vogt SL, Finlay BB. Gut microbiota-mediated protection against diarrheal infections. *J Travel Med*. 2017 Apr 1;24(suppl_1):S39-S43. DOI: 10.1093/jtm/taw086
13. Цыгина ТЮ, Чеботарева ТВ. Проявления дисбактериоза кишечника у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом органов дыхания. *Туберкулез и болезни легких*. 2009;86(12):62-71.
14. Hu Y, Yang Q, Liu B, Dong J, Sun L, Zhu Y, et al. Gut microbiota associated with pulmonary tuberculosis and dysbiosis caused by anti-tuberculosis drugs. *J Infect*. 2019 Apr;78(4):317-322. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.08.006
15. Luo M, Liu Y, Wu P, Luo DX, Sun Q, Zheng H, et al Y. Alternation of Gut Microbiota in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Front Physiol*. 2017 Nov 17;8:822. DOI: 10.3389/fphys.2017.00822
16. Лабинская АС, Блинкова Л, Ещина АС, и др. Частная медицинская бактериология с техникой микробиологических исследований. СПб.: Издательство «Лань»; 2020, 608 с.

References

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. Nechaeva OB, Son IM, Gordina AV, et al. Resources and activities of TB organizations of the Russian Federation in 2019–2020 (statistical materials). Moscow, 2021, 112 p. (In Russian).
3. Dumas A, Corral D, Colom A, Levillain F, Peixoto A, Hudrisier D, et al. The Host Microbiota Contributes to Early Protection Against Lung Colonization by *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol*. 2018 Nov 14;9:2656. DOI: 10.3389/fimmu.2018.0265
4. Eribo OA, du Plessis N, Ozturk M, Guler R, Walzl G, Chegou NN. The gut microbiome in tuberculosis susceptibility and treatment response: guilty or not guilty? *Cell Mol Life Sci*. 2020 Apr;77(8):1497-1509. DOI: 10.1007/s00018-019-03370-4
5. Kozhevnikov AA, Raskina KV, Martynova EYu, Tyacht AV, Perfiliev AV, Drapkina OM, et al. Intestinal microbiota is a community of different types of microorganisms inhabiting the human intestine. *RMJ (Russian Medical Journal)*. 2017;25(17):1244-7 (In Russian).
6. Nikonov, EL, Gurevich G, Terent'ev AYU. Microbiota of various loci of the body. Edited by Nikonov EL, Popova EN. Moscow: "Media Sfera" Publ.; 2019, pp. 58-89 (In Russian).
7. Kravchuk EN, Neimark AE, Grineva EN, Galagudza MM. The role of gut microbiota in metabolic regulation. *Diabetes Mellitus*. 2016;19(4):280-285. DOI: 10.14341/DM7704 (In Russian).
8. Ardatskaya MD. Role of dietary fiber in correcting microbiota disorders and maintaining immunity. *RMJ (Russian Medical Journal)*. 2020;12:24-29 (In Russian).
9. Goloshubina VV, Trukhan DI, Bagisheva NV. Intestinal microbiocenosis disorder: current aspects of terminology, clinical picture and prevention. *RMJ (Russian Medical Journal)*. 2020;12:17-22 (In Russian).
10. Schirmer M, Smeeckens SP, Vlamakis H, Jaeger M, Oosting M, Franzosa EA, et al. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):1125-1136.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.020

11. Schirmer M, Smeekens SP, Vlamakis H, Jaeger M, Oosting M, Franzosa EA, et al. Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):1125-1136.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.020. Erratum in: *Cell*. 2016 Dec 15;167(7):1897. Erratum in: *Cell*. 2016 Dec 15;167(7):1897.
12. Vogt SL, Finlay BB. Gut microbiota-mediated protection against diarrheal infections. *J Travel Med*. 2017 Apr 1;24(suppl_1):S39-S43. DOI: 10.1093/jtm/taw086
13. Tsygina TYu, Chebotareva TV. Manifestations of colonic dysbacteriosis in patients with drug-resistant respiratory tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2009;86(12):62-71 (In Russian).
14. Hu Y, Yang Q, Liu B, Dong J, Sun L, Zhu Y, et al. Gut microbiota associated with pulmonary tuberculosis and dysbiosis caused by anti-tuberculosis drugs. *J Infect*. 2019 Apr;78(4):317-322. DOI: 10.1016/j.jinf.2018.08.006
15. Luo M, Liu Y, Wu P, Luo DX, Sun Q, Zheng H, et al Y. Alternation of Gut Microbiota in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Front Physiol*. 2017 Nov 17;8:822. DOI: 10.3389/fphys.2017.00822
16. Labinskaya AS, Blinkova L, Eshchina AS, et al. Private medical microbiology with the technique of microbiological research. St. Petersburg: "Lan" Publ.; 2020, 608 p. (In Russian).

Информация об авторах:

Комиссарова Оксана Геннадьевна, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной и лечебной работе ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», профессор кафедры фтизиатрии лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Андреевская Софья Николаевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Абдуллаев Ризван Юсиф Оглы, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, заведующий лабораторией биохимии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Information about authors:

Oksana G. Komissarova, MD, PhD, DSc, Deputy Director for Scientific and Medical Work of the Central Research Institute of Tuberculosis; Professor of the Department of Phthisiology, Faculty of Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University

Sofya N. Andreevskaya, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Microbiology, Central Research Institute of Tuberculosis

Rizvan Yu.O. Abdullaev, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pathomorphology, Cell Biology and Biochemistry, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Central Research Institute of Tuberculosis

НОВОСТИ НАУКИ

Новый веб-инструмент борется с антибактериальной устойчивостью

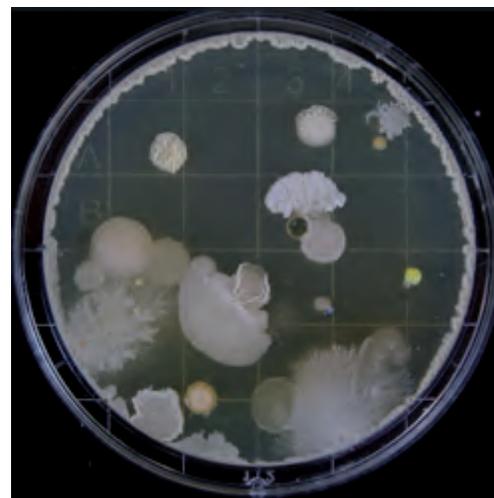
В 1943 г. Макс Дельбрюк и Сальвадор Лурия провели эксперимент, чтобы показать, что бактерии могут мутировать случайным образом, независимо от внешнего раздражителя, такого как антибиотик, угрожающий выживанию бактериальных клеток. Сегодня эксперимент Лурии–Дельбрюка широко используется в лабораториях с другой целью – ученые используют этот классический эксперимент для определения частоты микробных мутаций. При проведении эксперимента Лурии–Дельбрюка ученым нужны эффективные компьютерные алгоритмы для извлечения надежных оценок частоты мутаций из данных, а также хорошо разработанные программные инструменты для доступа к этим сложным алгоритмам.

На протяжении многих лет было разработано несколько веб-инструментов, которые позволяют исследователям более легко вводить и анализировать данные на компьютере, чтобы повысить эффективность и действенность эксперимента Лурии–Дельбрюка. Однако ни один из существующих веб-инструментов не позволяет ученым получить доступ ко многим недавно разработанным алгоритмам, которые могут извлекать из данных еще более точные оценки частоты микробных мутаций.

Ци Чжэн, профессор Школы общественного здравоохранения Техасского университета A&M, недавно разработал новый веб-инструмент под названием webSalvador, чтобы заполнить несколько пробелов, оставленных существующими веб-инструментами. В журнале «Microbiology Resource Announcements» (MRA) Чжэн объясняет, как webSalvador предлагает множество желаемых возможностей, которые жизненно важны для исследования мутаций бактерий, включая более точные методы построения доверительных интервалов и новые методы для сравнения уровней мутаций.

Новый веб-инструмент также избавляет ученых от необходимости изучать язык программирования и программного обеспечения, что Чжэн назвал «важным препятствием» для использования эксперимента Лурии–Дельбрюка для решения важных проблем в исследованиях мутаций, таких как глобальная головная боль общественного здравоохранения, связанная с бактериальными препаратами.

Повышение эффективности и действенности эксперимента Лурии–Дельбрюка важно, потому что он в конечном итоге может помочь продвинуть вперед исследования мутаций, что имеет жизненно важное значение для многих областей наук о жизни.



Zheng Q.

webSalvador: a Web Tool for the Luria-Delbrück Experiment.

Microbiol Resour Announc. 2021 May 20;10(20):e00314-21. DOI: 10.1128/MRA.00314-21

Микробиологические процессы в переработке минерального сырья: растворение различных видов фосфатных руд под действием штамма *Trichoderma asperellum* GJS 03-35

С.К.Жиглецова¹, И.А.Дунайцев¹, Т.Н.Кондрашенко¹, А.В.Ариповский², М.В.Клыкова¹, Л.В.Коломбет¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

²Научно-производственная компания ООО Фирма «А-БИО», Пущино, Московская область, Российская Федерация

Изучено растворение фосфатных руд девяти отечественных и наиболее крупных зарубежных месторождений различного генезиса под действием штамма *Trichoderma asperellum* №16, обладающего высокими антагонистическими свойствами против различных возбудителей болезней растений, а также ростостимулирующими свойствами. Доступность фосфатных руд воздействию *T. asperellum* зависела от происхождения руды и различалась более чем в 100 раз. Наиболее доступными оказались океанические осадочные фосфориты. Процесс растворения минерального фосфорного сырья под действием *T. asperellum* имеет сложный механизм, обусловленный как участием органических кислот, так и другими факторами, основным из которых является выброс протонов при поглощении клетками иона аммония.

Ключевые слова: фосфатные руды, фосфатрастворяющие микроорганизмы, *Trichoderma asperellum*, биофосфорные удобрения

Для цитирования: Жиглецова С.К., Дунайцев И.А., Кондрашенко Т.Н., Ариповский А.В., Клыкова М.В., Коломбет Л.В. Микробиологические процессы в переработке минерального сырья: растворение различных видов фосфатных руд под действием штамма *Trichoderma asperellum* GJS 03-35. Бактериология. 2022; 7(1): 32–39. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-32-39

Microbiological processing of mineral raw materials: dissolution of various types of rock phosphates by *Trichoderma asperellum* GJS 03-35

S.K.Zhigletsova¹, I.A.Dunaytsev¹, T.N.Kondrashenko¹, A.V.Aripovsky², M.V.Klykova¹, L.V.Kolombet¹

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

²Research and Production Company «A-BIO», Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

The dissolution of rock phosphates from 9 domestic and largest foreign deposits of various genesis by *Trichoderma asperellum* strain No 16, which has high antagonistic properties against various pathogens of plant diseases, as well as growth-stimulating properties, has been studied. The availability of rock phosphates to *T. asperellum* depended on their origin and varied by more than 100 times. The most accessible were oceanic sedimentary phosphorites. The process of dissolution of rock phosphates by *T. asperellum* has a complex mechanism due to both the participation of organic acids and other factors, the main of which is the emission of protons upon absorption of ammonium ion by cells.

Key words: rock phosphates, phosphate solubilizing microorganisms, *Trichoderma asperellum*, biophosphoric fertilizers

For citation: Zhigletsova S.K., Dunaytsev I.A., Kondrashenko T.N., Aripovsky A.V., Klykova M.V., Kolombet L.V. Microbiological processing of mineral raw materials: dissolution of various types of rock phosphates by *Trichoderma asperellum* GJS 03-35. Bacteriology. 2022; 7(1): 32–39. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-32-39

Для корреспонденции:

Жиглецова Светлана Константиновна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0000
E-mail: zhigletsova@obolensk.org

Статья поступила 23.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Svetlana K. Zhigletsova, PhD (Chemical Sciences), Senior Researcher, Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0000
E-mail: zhigletsova@obolensk.org

The article was received 23.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

Грибы рода *Trichoderma* часто упоминаются в литературе в связи с повышением безопасности продуктов питания и экологической безопасности при борьбе с болезнями растений. Это связано с их способностью подавлять развитие широкого спектра фитопатогенов, не повреждая растений и не нанося вреда другим полезным объектам окружающей среды [1]. В результате многолетних исследований в ГНЦ ПМБ был выделен штамм №16 *Trichoderma viride* Pers ex S.F.Gray, позднее идентифицированный как *T. asperellum* Samuels, Lieckfelt et Nirenberg, GLS 03-35 [2, 3]. На основе этого штамма был разработан препарат Микол [4, 5]. Штамм и препарат обладают высокими антагонистическими свойствами против различных возбудителей болезней растений, а также ростостимулирующими свойствами.

Впервые нами было показано наличие способности у грибов вида *T. asperellum* и, в частности, у штамма *T. asperellum* Samuels, Lieckfelt et Nirenberg, GLS 03-35 высвобождать фосфор из трикальцийфосфата (ТКФ) – модельного аналога минеральных фосфатных руд [6, 7]. Обнаруженная способность особенно важна в связи с возможностью использования микроорганизмов для разработки биофосфорных удобрений, в которых эффективное высвобождение фосфора из руд происходит непосредственно в полевых условиях и не наносит вреда окружающей среде [8–12]. Таким образом, сочетание биологически и экономически важных свойств у отобранного гриба рода *Trichoderma* позволяет рассматривать его в качестве перспективного продуцента биопрепаратов комбинированного действия – пролонгированного биоудобрения с фунгицидными свойствами на основе фосфатной руды в качестве источника фосфора. Однако известно, что фосфатные руды могут различаться по доступности для одного микроорганизма более чем в 5 раз и под влиянием руды может изменяться даже механизм растворения фосфатов [13]. Поэтому **целью настоящего исследования** являлось изучение растворения различных типов фосфатных руд под воздействием штамма *T. asperellum* №16 GJS 03-35, необходимое для последующей разработки комбинированного биофосфорного удобрения на его основе.

Материалы и методы

Штамм *Trichoderma viride* Pers ex S.F.Gray №16, обладающий гиперпаразитической активностью по отношению к широкому спектру фитопатогенов, в том числе к грибам рода *Fusarium* [3, 4], получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии («ГКПМ-Оболенск»). По уточненной классификации этот штамм относится к виду *T. asperellum* Samuels et al. (в Коллекции Лаборатории ботаники и систематики, Белтсвилль, ему присвоен индекс GLS 03-35) [2, 4].

Оценку фосфатрастворяющих свойств штамма №16 *T. asperellum* проводили по накоплению фосфата в растворе при культивировании гриба в жидкой среде, содержащей нерастворимый фосфат, в качестве которого использовали различные фосфатные руды.

Для определения фосфатрастворяющей активности в жидкой среде культуру гриба вносили в стерильную минеральную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0;

аммоний хлористый – 1,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; фосфатная руда с содержанием P_2O_5 2,5 г, соответствующим содержанию P_2O_5 в $Ca_3(PO_4)_2$, который использовался в качестве модельного нерастворимого фосфата [6, 7]; микроэлементы – 20 мл/л. Состав раствора микроэлементов, %: сульфат железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) – 0,01; сульфат меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) – 0,1; сульфат марганца ($MnSO_4 \cdot 2H_2O$) – 0,01. Посевная доза во всех случаях составляла 0,5 мл жидкой культуры гриба, выращенной во встряхиваемой колбе [4]. Инкубирование вели в колбах вместимостью 750 мл с объемом среды 100 мл на качалке IRC-1U (Kühner, Швейцария) при скорости вращения 160–180 об./мин при температуре 28°C в течение 6 суток, отбирая пробы объемом 1,5–2 мл для измерений pH и содержания фосфатов. pH измеряли на pH-метре ThermOrion 710 (Thermo Fisher Scientific, США).

Перед определением количества фосфора в растворе пробу центрифугировали на микрофуге Minispin (Eppendorf, Германия) в течение 5 мин при 10000 об./мин. В полученном супернатанте количество растворенного фосфора определяли с помощью одностадийного метода по интенсивности окраски его молибденового комплекса с твином 80 при длине волны 350 нм [14]. Измерение фосфора в растворе проводили в трех повторностях на спектрофотометре UNICO 2800 (United Products & Instruments, США). Каждый опыт повторяли дважды.

Определение метаболитов, обуславливающих фосфатрастворяющую активность штамма №16 *T. asperellum*, проводили методом газовой хроматографии. Для газохроматографического определения глюкозы и образующихся из нее метаболитов к супернатанту культуральной жидкости (КЖ), приготовленному так же, как для определения растворенного фосфора, прибавляли 10% (по объему) 0,3М раствора оксалата натрия. После удаления осадка оксалата кальция центрифугированием к аликвоте супернатанта, отвечающей приблизительно 200–500 мкг исходной глюкозы, прибавляли 250 мкг маннита (внутренний стандарт) в виде 0,25%-го водного раствора. Затем пробу высушивали в вакууме, и остаток силанизировали смесью 150 мкл сухого пиридина и 150 мкл бис(триметилсилил)трифторацетамида, содержащего 2% триметилхлорсилана. Хроматографирование пертриметилсилильных эфиров определяемых веществ проводили на хроматографе HP5890 (Hewlett-Packard, США) при использовании колонки с полидиметилсилоксановой фазой SPB-1 и пламенно-ионизационного детектора. Метод ввода пробы – с делением потока газа-носителя. Температурная программа – от 100°C (1 мин) до 290°C со скоростью 10°C/мин.

В работе использовали фосфатсодержащие руды различного состава и структуры из коллекции отдела биологических технологий ГНЦ ПМБ [9] (табл. 1). Для изучения биодоступности разных групп фосфатного сырья отбирали по 1–2 вида схожих по составу руд из определенных групп сырья. Из образцов всех исследованных руд на ситах выделяли фракции от 40 до 100 мкм и использовали в дозах, эквивалентных по фосфору стандартной дозе ТКФ при исследованиях в жидкой среде, составлявшей 9,0 г/л.

Результаты и обсуждение

Для изучения отобрали руды месторождений, активно разрабатываемых в настоящий момент или представляю-

Таблица 1. Характеристика образцов рудного фосфатного сырья																	
№ в опыте	Группа руд	Тип сырья	Месторождение	P ₂ O ₅	CaO	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	CO ₂	SO ₃	SiO ₂	K ₂ O	Na ₂ O	MgO	F	Cl	Орг. в-ва и др.	Основные и характерные минералы
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	Апатиты эндогенные	Апатит-бадделейт-магнетитовый	Ковдорское, РФ	37,55	53,68	0,16	0,29						2,44	0,93		0,18	Апатит, магнетит, бадделейт, форстерит, флогопит, пироксен, диопсид
2	Апатиты экзогенные	Апатитовый в корях выветривания	Новополтавское, Украина	33,47	52,93	0,44	0,0	8,53	0,0		0,05	0,32	1,02	2,46		н.о.	Апатит, гидрослюды, полевой шпат
3	Фосфориты экзогенные	Фосфориты океанического залегания	Со дна Японского моря	26,3	43,4	3,1	1,9	3,8	2,5	7,9		1,2	0,9	2,8		9,10	Фосфат (фторкарбонатапатит-курскит), карбонатно-глинистые и кремнистые минералы, пирит
4	Фосфориты морские	Фосфориты залегания	Шельф Намибии	25,62	38,64	1,79	3,31	3,80	Собш 1,19	12,3	0,89	2,2	1,6	2,55		1,00	Фосфориты со дна океана позднечетвертичные конкреции
5	Фосфориты экзогенные морские	Желваковский	Вятско-Камское, РФ	23,5	36,3	4,6	2,3	4,7		16,0		0,8	1,8	2,5		10,4	Фосфат, глауконит, кварц, кальцит, пирит, гидроксиды, гидрослюды
6	Фосфориты морские	Желваковский	Егорьевское, РФ	20,0	33,1	7,5	3,7	5,5		19,0		0,8	1,3	2,2		11,7	Фосфат, глауконит, кальцит, кварц, сидерит, гипс, пирит, гидроксиды железа
7	Фосфориты экзогенные морские	Ракушечниковый	Кабала, Эстония	28,45	43,53	0,96	0,78	5,23	1,05	15,18	0,07	0,49	1,7	2,58	0,97	6,31	Фосфат (франколит), доломит, кальцит, гипс, пирит, глауконит
8	Фосфориты экзогенные морские	Ракушечниковый	Кингисеппское, РФ	27,4	43,7	0,91	0,6	5,8		13,2		0,6	2,2	2,8		7,33	Фосфатизированные раковины, кварц с ожелезением, доломит, пирит, глауконит
9	Экзогенные континентальные	Остаточно-метасоматические коры выветривания	Озерское, РФ	35,7	51,5	1,0	1,1	1,2	1,2			0,2		3,3		2,96	Фосфат, вавелит, кальцит, кварц

Таблица 2. **Продукция кислот (ГК и КГК) из глюкозы под действием *T. asperellum*, определенная по данным газовой хроматографии (ГХ) и рассчитанная по содержанию мобилизованного фосфора при растворении руд**

№ руды	Максимальная концентрация ГК по данным ГХ, г/л	Максимальная концентрация КГК по данным ГХ, г/л	Максимальная суммарная концентрация кислот по данным ГХ, г/л	Концентрация кислот, рассчитанная по растворенному фосфору, г/л
1	0,3	0,1	0,4	0,215
2	4,8	1,3	6,1	0
3	0,07	0,05	0,12	0,500
4	2,0	1,5	3,5	1,408
5	0,9	0,2	1,1	0,090
6	0,1	0,02	0,12	0,210
7	1,0	0,8	1,8	0,097
8	0,1	0,1	0,2	0,026
9	0	0	0	0,315

щих интерес в перспективе для промышленной разработки. Исследовали доступность 9 образцов фосфатных руд различной структуры и генезиса: желваковые, ракушечные, фосфориты морского генезиса – шельфовые, фосфориты континентальные остаточно-метасоматические и апатиты [15]. В Российской Федерации (РФ) главные фосфорные ресурсы представляют желваковые фосфориты и апатиты, составляющие соответственно 19,7 и 70,6% от всех запасов фосфора в РФ [15]. Основные характеристики использованных руд и их состав представлены в табл. 1.

Результаты по динамике высвобождения фосфора из руд под действием штамма №16 *T. asperellum* представлены на рис. 1. Для удобства восприятия данные разнесены на две условные группы – более и менее реакционно способные типы рудного сырья.

Как следует из рис. 1, фосфатные руды по доступности для штамма №16 *T. asperellum* различаются более чем в 100 раз, и динамика высвобождения фосфора индивидуальна практически для каждой руды. Так, быстрее остальных растворялись океанические шельфовые фосфориты (№№ 3, 4), но намибийский (№4) растворялся в полтора раза быстрее и конечное значение растворенного фосфора для него более чем в 2 раза выше, чем для фосфоритов со дна Японского моря (№3). Желваковая егорьевская руда (№6) заметно растворялась только в первые сутки, затем процесс стабилизировался, а вятская желваковая руда растворялась в течение 3 суток, однако к 6-м суткам количество фосфора в растворе упало более чем вдвое. Медленно, но в течение всего срока наблюдения растворялись ракушечный кингис-

сепский фосфорит (№8) и ковдорский апатит (№1). Последний факт особенно замечателен, поскольку апатиты являются более концентрированным и более распространенным в РФ фосфорсодержащим сырьем, чем фосфориты.

По своей доступности для штамма №16 *T. asperellum* заметно выделялись океанические фосфориты, особенно намибийский, который за 6 суток перевел в растворимое состояние более 18% фосфора от значения, полученного для модельного ТКФ [7]. Наименее доступным оказался новополтавский апатит (№2). Он практически не растворялся под действием гриба и, более того, вызывал гибель культуры.

Различие в доступности фосфорсодержащих руд, по-видимому, прежде всего обусловлено их структурой. Практически полностью аморфными по структуре являются океанические шельфовые фосфориты, поэтому они и легче всех растворялись, что соответствует данным для других микроорганизмов [9]. Ракушечные и желваковые фосфориты включают формирования частично аморфной структуры, что также облегчает их растворение. Апатитовые руды представляют собой в основном кристаллические образования вулканического генезиса и с точки зрения структуры являются наименее растворимыми. Очевидно, что различие в растворимости ковдорского (№1) и новополтавского (№2) апатитов обусловлено их элементарным составом: в последнем, например, в 2,5 раза больше фтора (табл. 1).

Как было показано нами ранее [7], *T. asperellum* значительно лучше растворяет модельное сырье – ТКФ, содержащее такое же количество фосфора, что и исследованные руды, и концентрация фосфора в растворе при аналогичных

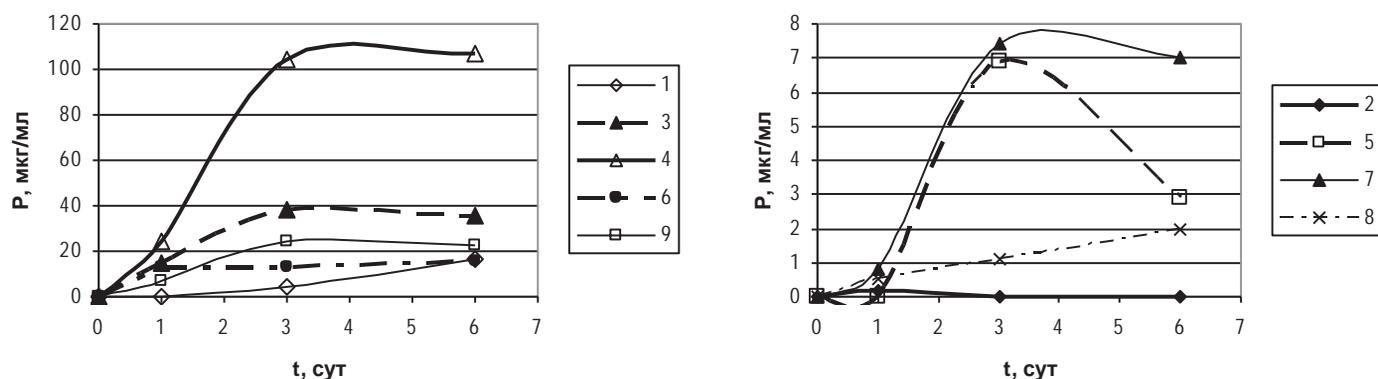


Рис. 1. Высвобождение фосфора в растворимое состояние из различных руд под действием штамма №16 *T. asperellum* (номера руд соответствуют табл. 1).

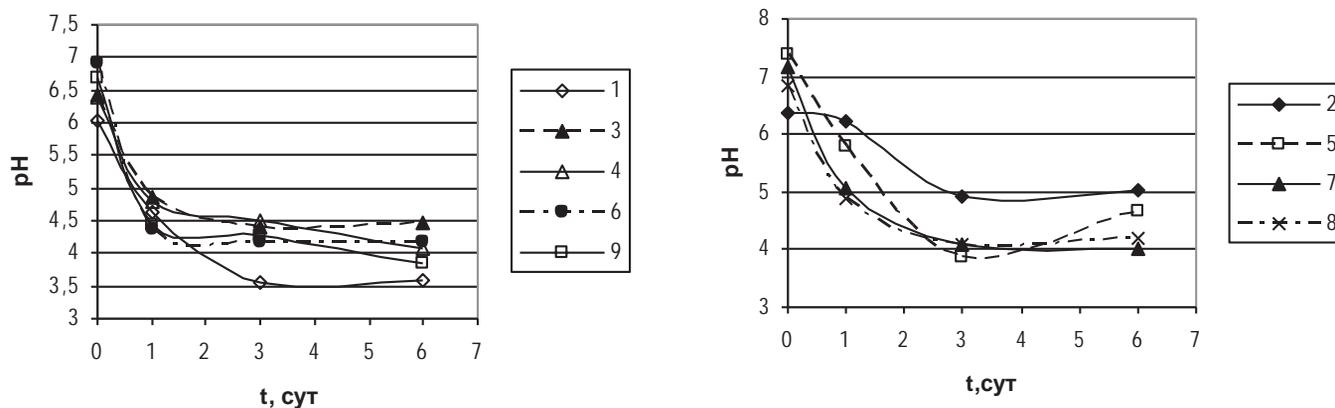


Рис. 2. Изменение pH при высвобождении фосфора в растворимое состояние из различных руд под действием штамма №16 *T. asperellum* (номера руд соответствуют табл. 1).

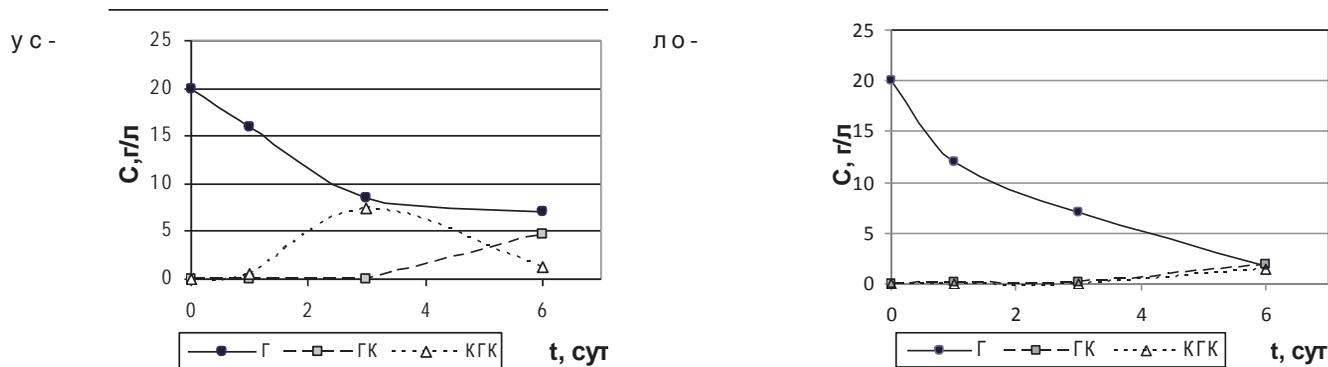


Рис. 3. Изменение концентраций глюкозы (Г), глюконовой (ГК) и кетоглюконовой (КГК) кислот при высвобождении фосфора под действием *T. asperellum* из новопоплавского апатита (а) и намибийского шельфового фосфорита (б).

виях достигала 590 мкг/мл. Как следует из рис. 1, такого уровня мобилизации фосфора при растворении рудного сырья не было достигнуто ни в одном случае за весь период наблюдения (6 суток).

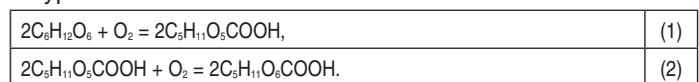
Изменения pH, наблюдавшиеся в процессах высвобождения фосфора из различных руд под действием *T. asperellum* шт. №16, не были так значительны, как изменения концентраций перешедшего в раствор фосфора, и в основном носили схожий характер (рис. 2): закисление в первые 1–3 суток до pH 3,5–5,0 и к 6-м суткам – стабилизация.

Отклонения наблюдали в трех случаях. Для вятской желваковой руды (№5) после закисления в течение первых трех суток происходило заметное повышение pH к 6-м суткам, что коррелировало с падением содержания фосфора в растворе для этой руды (рис. 1б). Для намибийского (№4) и континентального остаточного метасоматического озерского (№9) фосфоритов снижение pH наблюдали в течение всего периода наблюдения. Для варианта №9 также наблюдали прямую корреляцию изменения pH с растворением фосфора в течение всего опыта.

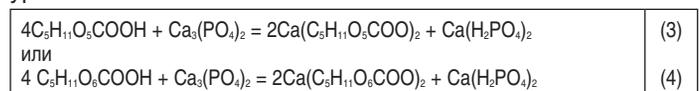
Сопоставление динамики высвобождения фосфора в раствор из руд и изменения pH (рис. 1, 2) позволяет сделать вывод, что высвобождение фосфора из руд, как и из ТКФ, определяется образованием кислых продуктов.

Из литературы известно, что основным механизмом, с помощью которого микроорганизмы переводят в раствор фосфаты, является образование различных органических кислот из углеводного субстрата [16–18]. Наиболее распростра-

ненным процессом как для бактерий, так и для грибов является образование глюконовой и кетоглюконовой кислот из глюкозы с помощью фермента глюкозодегидрогеназы [19]. Некоторые бактерии почти стехиометрически окисляют глюкозу последовательно до соответствующих кислот [20–22] по уравнениям



Образовавшиеся кислоты (глюконовая и кетоглюконовая) обуславливают растворение минерального фосфата по уравнениям



Для изучения механизма растворения руд под действием штамма №16 *T. asperellum* исследовали основные метаболиты, образующиеся в ходе процесса.

Как показал газохроматографический анализ, при растворении руд основными метаболитами, осуществлявшими мобилизацию фосфора, в отличие от растворения ТКФ [7], являлись глюконовая и кетоглюконовая кислоты (рис. 3). Однако определяющую роль в процессе растворения фосфатов, очевидно, играли структура и состав руды, а не количество продуцируемых микроорганизмом кислот. В качестве иллюстрации последнего утверждения на рис. 3 представлена динамика изменения концентраций кислот при высвобождении фосфора из двух руд, наиболее и наименее активно растворявшихся под действием *T. asperellum* – новопоплав-

ского апатита (№2 на рис. 1б) и намибийского шельфового фосфорита (№4 на рис. 1а).

Как видно из рис. 3, в присутствии новополтавского апатита, практически не растворявшегося под действием *T. asperellum* (рис. 1б), в растворе находилось значительно больше кислот, чем в присутствии наиболее активно растворявшегося океанического фосфорита с шельфа Намибии (рис. 1а), хотя величины рН для обоих видов руд различались мало (рис. 2). Для остальных руд, кроме №9, изменение концентраций глюкозы, глюконовой и кетоглюконовой кислот под действием *T. asperellum* имело вид, сходный по характеру изменений с динамикой растворения намибийского шельфового фосфорита на рис. 3б.

В табл. 2 приведены данные по максимальной продукции кислот для каждого вида руды, определенные методом газовой хроматографии, а также рассчитанные по уравнениям (3) и (4), исходя из количества фосфора, перешедшего в раствор. Как видно из табл. 2, ни для одной руды не наблюдали равенства концентрации суммы глюконовых кислот, обнаруженных в растворе и рассчитанных по растворенному фосфору в соответствии с уравнениями (3) и (4). Такое равенство фиксировали ранее при изучении высвобождения фосфора из нерастворимого сырья под действием бактерий, осуществляющих самый эффективный механизм [8, 22]. Однако для штамма №16 *T. asperellum* для шести руд (№№ 1, 2, 4, 5, 7, 8) наблюдали избыток кислот примерно от 2 до 20 раз, а для двух руд (№№ 3, 6) – недостаток кислот от 2 до 5 раз. В случае озерской руды (№9) глюконовые кислоты вообще не обнаружили. Кроме того, при самом эффективном механизме вся глюкоза в среде переходит в кислоты, а в присутствии штамма №16 *T. asperellum* в кислоты превращалось <30% исходной глюкозы. Тем не менее очевидно, что в присутствии штамма №16 *T. asperellum* при растворении руд глюконовые кислоты играли существенную роль.

Очевидно, что ферментные системы, осуществляющие прямое окисление глюкозы в кислоты, активируются в присутствии руд определенного состава и структуры. Однако этот процесс сложен и трудно предсказуем, поскольку среди руд, способствующих продукции кислот, есть и наиболее, и наименее растворимые под действием штамма №16 *T. asperellum*.

Хотя в настоящее время образование органических кислот признано в качестве основного механизма мобилизации фосфатов из минеральных источников под действием микроорганизмов, в большинстве случаев не наблюдается полного соответствия растворенного фосфора содержанию образовавшихся органических кислот [16–18]. Для объяснения этого несоответствия было выдвинуто предположение, что при недостатке или даже в отсутствии продукции органических кислот высвобождение фосфора может быть обусловлено выбросом протонов, сопровождающим дыхание или ассимиляцию NH_4^+ [23, 24]. В нашем исследовании в трех случаях наблюдался недостаток суммы глюконовых кислот для мобилизации обнаруживаемого в растворе фосфора (для руд №№ 3, 6 и 9 в табл. 2). При этом в растворе присутствовало не более 40 мкг/мл, или 1,29 ммоль/л фосфора (рис. 1а). Поглощение даже десятой части имеющегося в среде аммония уже могло дать более чем достаточное

количество протонов (3 ммоль/л) для мобилизации обнаруживаемого количества фосфора. Таким образом, полученные данные подтверждают известный по литературным источникам факт, что в присутствии различных руд могут реализовываться различные механизмы высвобождения фосфатов для одного и того же микроорганизма [13].

Другие виды грибов рода *Trichoderma*, как и все микроорганизмы, также менее активны при растворении фосфатных руд по сравнению с растворением ТКФ. Так, в присутствии *T. viridae* (NFCCI 1999) из руды (месторождение и состав в работе не указаны) переходило в раствор на 40% меньше фосфора, чем из ТКФ [25]. В присутствии *T. isridae* и *T. harzianum* из нигерийской руды, состав которой также не указан, высвобождалось соответственно в 2 и в 40 раз меньше фосфора, чем из ТКФ [26]. Состав органических кислот был изучен только для *T. isridae* в присутствии одной руды. При этом наблюдали избыток кислот по отношению к растворенному фосфору, однако при растворении руды изменялся их качественный и количественный состав: не обнаруживались глутаровая и яблочная кислоты, но появлялась лимонная [26].

Максимальные значения концентраций растворенного фосфора для рудного сырья под действием штамма *T. asperellum* №16 составляли 0,2–107 мкг/мл (рис. 1). Для сравнения, в сходных условиях наиболее активные из известных в мировой практике бактериальные штаммы при растворении руд высвобождали фосфора >500 мкг/мл [9, 22]. Таким образом, штамм *T. asperellum* №16 проявлял более низкие фосфатрастворяющие свойства, чем наиболее активные из известных до сих пор микроорганизмов. В то же время по сравнению с другими грибами рода *Trichoderma* исследуемый штамм №16 *T. asperellum* проявляет довольно высокую фосфатрастворяющую активность при сходных условиях.

Наиболее важным в проведенных исследованиях является доказательство возможности высвобождения растворимого фосфора под действием штамма №16 *T. asperellum* из всех типов исследованных руд (океанические шельфовые, желваковые, апатитовые, ракушечные, остаточные метасоматические). Хотя в использовавшихся лабораторных условиях все исследованные руды были существенно слабее подвержены воздействию штамма №16 *T. asperellum*, чем ТКФ, следует отметить, что лабораторное определение доступности фосфорных руд воздействию микроорганизмов значительно отличается от процессов, происходящих в природных условиях. В природе существенно ниже аэрация, а также, как правило, ниже концентрация питательных веществ. Поэтому все процессы происходят значительно медленнее, чем в лаборатории. Однако *in situ*, при постоянном восполнении питательных веществ и поддержании условий размножения микроорганизмов, высвобождение фосфатов из минерального сырья под воздействием микроорганизмов может происходить весьма длительное время. Многочисленные литературные данные показали, что внесенные в почву фосфоритные руды полностью растворялись в течение нескольких лет [27]. Поэтому применение штамма №16 *T. asperellum* совместно с доступными рудами может быть перспективно для создания биофосфорного удобрения и, тем самым, улучшения фосфорного питания растений.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

- Zin NA, Badaluddin NA. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Ann Agricult Sci*. 2020;65:168–78.
- Samuels GJ, Lieckfeldt E, Nirenberg HI. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conodia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*. 1999;51:71-88.
- Kolombet LV, Sokolov MS, Chuprina VP, Schisler DA, Samuels GJ. Preparation on the basis of *Trichoderma asperellum* in the system of biological protection of wheat from *Fusarium* ear scab. *Agriculture and life sciences. Proc. of Eighth Intern. Workshop on Trichoderma and Gliocladium*. April 2004. Hangzhou, China. *J of Zhejiang University*. 2004;30(4):394-5.
- Коломбет ЛВ, Жиглецова СК, Дербышев ВВ, Езов ДВ, Косарева НИ, Быстрова ЕВ. Изучение Микофунгицида на основе *Trichoderma viride* – препарата для борьбы с болезнями растений. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2001;37(1):110-4.
- Коломбет ЛВ. Обоснование оптимальных доз биопрепарата для озимой пшеницы. *Агро XXI*. 2006;7-9:40-44.
- Дунайцев ИА, Коломбет ЛВ, Жиглецова СК, Быстрова ЕВ, Бесаева СГ, Клыкова МВ, Кондрашенко ТН. Фосфатмобилизирующие микроорганизмы – антагонисты фитопатогенов. *Микология и фитопатология*. 2008;42(3):264-9.
- Коломбет ЛВ, Дунайцев ИА, Жиглецова СК. Комбинация свойств микроорганизмов – новый подход к созданию биопрепаратов для растениеводства. *Бактериология*. 2016;1(1):54-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-54-61
- Goldstein AN. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Velazquez E and Rodriguez-Barrueco C (eds.), Springer, 2007, pp. 91-96.
- Дунайцев ИА. Выделение фосфатсольбилизирующих микроорганизмов и изучение возможности их использования в промышленности и сельском хозяйстве. Дисс. ... канд. биол. наук. Оболенск, 2010, 186 с.
- Дунайцев ИА, Старшов АА, Перельгин ВВ, Клыкова МВ, Кондрашенко ТН. Эффективность экспериментальных образцов микробиологических фосфорных удобрений на ячмене. *Агро XXI*. 2008;1-3:35-6.
- Дунайцев ИА, Сомов АН, Вирысов СН, Старшов АА, Кондрашенко ТН, Клыкова МВ, Жиглецова СК. Эффективность использования фосфатрастворяющих микроорганизмов в составе гранулированных биоудобрений с фосфатной рудой. *Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ*. 2016;(117):251-68.
- Дунайцев ИА, Старшов АА, Сомов АН, Клыкова МВ, Жиглецова СК. Использование фосфатрастворяющих бактерий и арбускулярного микоризного гриба *Glomus intraradices* для повышения мобилизации фосфора из фосфоритной руды. *Агрохимия*. 2017;(9):82-9. DOI: 10.7868/S0002188117090095
- Reyes I, Baziramakenga R, Bernier L, Antoun H. Solubilisation of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol Biochem*. 2001;33:1741-7.

- Пупышев АБ. Стабильный реактив для одностадийного определения неорганического фосфата. *Лабораторное дело*. 1991;(9):12-6.
- Левин БВ, Ангелов АА. Экологическая классификация фосфатного сырья. *Химическая промышленность сегодня*. 2003;(6):41-9.
- Banik S, Dey BK. Phosphate solubilizing microorganisms of a lateritic soil. I. Solubilization of inorganic phosphates and production of organic acids by microorganisms. *Zentralblatt Bacteriol Abt*. 1981;136:478-86.
- Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*. 1999;17:319-39.
- Sharon JA, Hathwaik LT, Glenn GM, Imam SH, Lee CC. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2016;16(2):525-36.
- Duine JA. Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur J Biochem*. 1991 Sep 1;200(2):271-84. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16183.x
- Elfari M, Ha SW, Bremus C, Merfort M, Khodaverdi V, Herrmann U, Sahn H, Görlich H. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Mar;66(6):668-74. DOI: 10.1007/s00253-004-1721-4
- Song OR, Lee SJ, Lee YS, Lee SC, Kim KK, Choi YL. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Braz J Microbiol*. 2008 Jan;39(1):151-6. DOI: 10.1590/S1517-838220080001000030
- Воложанцев НВ, Дунайцев ИА, Дятлов ИА, Жиглецова СК, Калмантаев ТА, Киреев ГВ, и др. Экологичные средства борьбы с патогенами человека, животных и растений. Под ред. Дятлова ИА. М.: ООО Буки Веди; 2019, 232 с.
- Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*. 1992;24:389-95.
- Illmer P, Schinner F. Solubilisation of inorganic calcium phosphates: solubilisation mechanisms. *Soil Biol Biochem*. 1995;27:257-63.
- Mahamuni SV, Wani PV, Patil AS. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using TCP & RP solubilization. *Asian J Biochem Pharm Res*. 2012;2:237-44.
- Akintokun AK, Akande GA, Akintokun PO, Popoola TOS, Babalola AO. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. *Int J Soil Sci*. 2007;2:301-7.
- Шильников ИА, Кирпичников НА, Белоцветова ОЮ. Эффективность применения молотых фосфатных руд при постоянном известковании дерново-подзолистой суглинистой почвы. *Агрохимия*. 1998;(5):58-67.

References

- Zin NA, Badaluddin NA. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Ann Agricult Sci*. 2020;65:168–78.
- Samuels GJ, Lieckfeldt E, Nirenberg HI. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conodia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*. 1999;51:71-88.
- Kolombet LV, Sokolov MS, Chuprina VP, Schisler DA, Samuels GJ. Preparation on the basis of *Trichoderma asperellum* in the system of biological protection of wheat from *Fusarium* ear scab. *Agriculture and life sciences. Proc. of Eighth Intern. Workshop on Trichoderma and Gliocladium*. April 2004. Hangzhou, China. *J of Zhejiang University*. 2004;30(4):394-5.
- Kolombet LV, Zhigletsova SK, Derbyshev VV, Ezhov DV, Kosareva NI, Bystrova EV. Izuchenie Mikofungitsida na osnove *Trichoderma viride* – preparata dlya bor'by s boleznyami rastenii. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2001;37(1):110-4. (In Russian).
- Kolombet LV, Sokolov MS. Rapid testing of antifungal, growth-regulating, and phytotoxic effects of seed fungicides. *Agricultural Chemistry*. 2006;7-9:40-4. (In Russian).

6. Dunaitsev IA, Kolombet LV, Zhigletsova SK, Bysirova EV, Besaeva SC, Klykova MV, Kondrashenko TN. Phosphate releasing microorganisms with antagonistic activity against phytopathogenic microorganisms. *Mycology and Phytopathology*. 2008;42(3):264-9. (In Russian).
7. Kolombet LV, Dunaitsev IA, Zhigletsova SK. Combined properties of microorganisms – new approach to designing bioformulations for plant growing. *Bacteriology*. 2016;1(1):54-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-54-61 (In Russian).
8. Goldstein AH. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Velazquez E and Rodriguez-Barrueco C (eds.), Springer, 2007, pp. 91-96.
9. Dunaitsev IA. Vydelenie fosfatsolyubiliziruyushchikh mikroorganizmov i izuchenie vozmozhnosti ikh ispol'zovaniya v promyshlennosti i sel'skom khozyaistve. Diss. Obolensk, 2010, 186 p. (In Russian).
10. Dunaitsev IA, Starshov AA, Perelygin VV, Klykova MV, Kondrashenko TN. Effektivnost' eksperimental'nykh obraztsov mikrobiologicheskikh fosfornykh udobrenii na yachmene. *Agro XXI*. 2008;(1-3):35-6. (In Russian).
11. Dunaitsev IA, Somov AN, Viryasov SN, Starshov AA, Kondrashenko TN, Klykova MV, Zhigletsova SK. The efficacy of using phosphate solubilizing microorganisms in granular biofertilizers with phosphate ore. *Scientific Journal of KubSAU*. 2016;(117):251-68. (In Russian).
12. Dunaytsev IA, Starshov AA, Somov AN, Klykova MV, Zhigletsova SK. Use of phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* for improving phosphorus mobilization from rock phosphate. *Agricultural Chemistry*. 2017;(9):82-9. DOI: 10.7868/S0002188117090095 (In Russian).
13. Reyes I, Baziramakenga R, Bernier L, Antoun H. Solubilisation of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol Biochem*. 2001;33:1741-7.
14. Pupyshv AB. Stabil'nyi reaktiv dlya odnostadiinogo opredeleniya neorganicheskogo fosfata. *Laboratornoe delo*. 1991;(9):12-6. (In Russian).
15. Levin BV, Angelov AA. Ekologicheskaya klassifikatsiya fosfatnogo syr'ya. *Khimicheskaya promyshlennost' segodnya*. 2003;(6):41-9. (In Russian).
16. Banik S, Dey BK. Phosphate solubilizing microorganisms of a lateritic soil. I. Solubilization of inorganic phosphates and production of organic acids by microorganisms. *Zentralblatt Bacteriol Abt*. 1981;136:478-86.
17. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv*. 1999;17:319-39.
18. Sharon JA, Hathwaik LT, Glenn GM, Imam SH, Lee CC. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *J Soil Sci Plant Nutr*. 2016;16(2):525-36.
19. Duine JA. Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur J Biochem*. 1991 Sep 1;200(2):271-84. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16183.x
20. Elfari M, Ha SW, Bremus C, Merfort M, Khodaverdi V, Herrmann U, Sahn H, Görisch H. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Mar;66(6):668-74. DOI: 10.1007/s00253-004-1721-4
21. Song OR, Lee SJ, Lee YS, Lee SC, Kim KK, Choi YL. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. *Braz J Microbiol*. 2008 Jan;39(1):151-6. DOI: 10.1590/S1517-838220080001000030
22. Volozhantsev NV, Dunaitsev IA, Dyatlov IA, Zhigletsova SK, Kalmantaev TA, Kireev GV, et al. Ekologichnye sredstva bor'by s patogenami cheloveka, zhivotnykh i rastenii. Edited by I.A.Dyatlov. Moscow: "Buki Vedi" Publ.; 2019, 232 p. (In Russian).
23. Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*. 1992;24:389-95.
24. Illmer P, Schinner F. Solubilisation of inorganic calcium phosphates: solubilisation mechanisms. *Soil Biol Biochem*. 1995;27:257-63.
25. Mahamuni SV, Wani PV, Patil AS. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using TCP & RP solubilization. *Asian J Biochem Pharm Res*. 2012;2:237-44.
26. Akintokun AK, Akande GA, Akintokun PO, Popoola TOS, Babalola AO. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. *Int J Soil Sci*. 2007;2:301-7.
27. Shil'nikov IA, Kirpichnikov NA, Belotsvetova OYu. Effektivnost' primeneniya molotykh fosfatnykh rud pri postoyannom izvestkovanii dornovo-podzolistoi suglinistoi pochvy. *Agricultural Chemistry*. 1998;(5):58-67. (In Russian).

Информация об авторах:

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кондрашенко Татьяна Николаевна, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ариповский Александр Викторович, кандидат химических наук, инженер, Научно-производственная компания ООО Фирма «А-БИО»

Клыкova Марина Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Колombet Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью, ученый секретарь ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Igor A. Dunaytsev, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Tatyana N. Kondrashenko, Researcher of Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Alexander V. Aripovsky, PhD (Chemical Sciences), Engineer of the Research and Production Company «A-BIO»

Marina V. Klykova, PhD (Biological Sciences), Researcher of Department of Biological Technologies, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Lyubov V. Kolombet, PhD, DSc (Biological Sciences), Scientific Secretary, Head of Science Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Характеристика культур, выделенных из почвы старого сибиреязвенного скотомогильника

Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

В современных условиях сохраняется риск заражения людей спорами *Bacillus anthracis* (возбудитель сибирской язвы), находящимися в почве, в результате хозяйственной профессиональной деятельности. В России зарегистрировано значительное количество почвенных очагов, которые проявляют себя в течение многих лет периодическими вспышками сибирской язвы среди сельскохозяйственных животных и людей. Наибольшую угрозу представляют сибиреязвенные скотомогильники (сибиреязвенные захоронения). Скотомогильником считается место для долговременного захоронения трупов сельскохозяйственных и домашних животных, погибших или забитых вследствие заболевания сибирской язвой. Попавший в почву возбудитель длительно сохраняет не только жизнеспособность, но и вирулентность.

Нами были исследованы пробы почвы, взятые на месте старого скотомогильника, существующего более 75 лет на берегу Иваньковского водохранилища в Конаковском районе Тверской области. Из этих проб были выделены три типа сибиреязвенных культур. Некоторые из них имели свойства, типичные для *B. anthracis*, другие отличались по ряду признаков. Была показана принципиальная возможность использования комплексной методики для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

Ключевые слова: сибирская язва, спора *Bacillus anthracis*, почва, скотомогильники

Для цитирования: Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. Характеристика культур, выделенных из почвы старого сибиреязвенного скотомогильника. Бактериология. 2022; 7(1): 40–46. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-40-46

Characteristics of bacterial cultures isolated from the soil of an old anthrax cattle burial ground

L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

Today, as a result of economic activity, there is a risk of infection of people by the spores of *Bacillus anthracis* (the causative agent of anthrax), located in the soil. A lot of soil foci have been registered in Russia, which manifest themselves for many years as periodic outbreaks of anthrax among farm animals and people. Anthrax cattle burial grounds (anthrax burials) pose the greatest threat. Animal burial ground is a place for long-term burial of the corpses of agricultural and domestic animals which have been died or were slaughtered due to anthrax. The pathogen that has entered the soil during its stay in the soil for a long time retains not only viability, but also virulence.

We studied soil samples taken at the site of an old cattle burial site that has existed for more than 75 years on the banks of the Ivankovskoye reservoir in the Konakovo district of the Tver region. Three types of anthrax cultures were isolated from these samples. Some of them had properties typical of *B. anthracis*, while others differed in a number of characteristics. The fundamental possibility of using a complex technique for typing anthrax strains and their differentiation from closely related microorganisms was shown.

Key words: anthrax, *Bacillus anthracis* spores, soil, cattle burial grounds

For citation: Marinin L.I., Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A. Characteristics of bacterial cultures isolated from the soil of an old anthrax cattle burial ground. Bacteriology. 2022; 7(1): 40–46. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-40-46

Для корреспонденции:

Маринин Леонид Иванович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24, ФБУН ГНЦ ПИМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: mokrievich@obolensk.org

Статья поступила 21.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Leonid I. Marinin, MD, PhD, Leading Researcher Laboratory of Anthrax Microbiology Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" territory, Obolensk, Moscow region, 142279 Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: mokrievich@obolensk.org

The article was received 21.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

Сибирская язва, о которой наслышаны многие, является особо опасным инфекционным заболеванием и относится к зооантропонозам – инфекционным заболеваниям, общим для животных и человека. Ее эпидемические проявления имеют большую социальную и экономическую значимость.

Несмотря на длительное существование инфекции, многочисленные исследования, связанные с разработкой методов диагностики и созданием средств специфической профилактики, проблема борьбы с сибирской язвой до настоящего времени актуальна для медицины и ветеринарии. Сибирская язва у людей постоянно регистрируется на территории России в виде единичных (спорадических) и, реже, групповых случаев. По классификации Всемирной организации здравоохранения, территория России относится к зоне спорадического проявления сибирской язвы [1]. При своевременном начале лечения летальных исходов не должно быть. Однако регистрируемые смертельные случаи (до 5–8% при кожной форме и 85–100% при висцеральных формах) дают основание считать сибирскую язву опасной инфекцией и оценивать современную эпидемическую обстановку по сибирской язве как довольно сложную, напряженную и не имеющую тенденции к стабилизации [2].

Сибирская язва опасна по ряду причин. Одной из них является длительная сохраняемость споровой формы возбудителя в окружающей среде. Высокая устойчивость спор возбудителя сибирской язвы к факторам внешней среды обуславливает формирование стойких очагов, в которых длительное время сохраняется опасность заражения человека и сельскохозяйственных животных [3].

Контаминированная почва может оставаться инфекционной многие годы, даже десятилетия. Одним из примеров служит вспышка, произошедшая в Савоие (Франция). Во время строительства автомагистрали в ходе работ было затронуто место захоронения животных, просуществовавшее 44 года после закрытия скотомогильника. Вследствие этого произошла контаминация пастбищ, что привело к возникновению заболеваний у животных, которые, в свою очередь, стали причиной заболеваний людей [4].

В Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. произошла вспышка сибирской язвы, которая не регистрировалась на Ямале 75 лет [5].

Наблюдался случай сибирской язвы у человека, заразившегося на месте захоронения трупов сельскохозяйственных животных, проведенного более 80 лет тому назад [6].

Показательна вспышка сибирской язвы в Австралии, возникшая в местности, где заболевания не регистрировались 83 года [7].

Заслуживает внимания сообщение о выделении двух жизнеспособных штаммов возбудителя сибирской язвы из костей животных, найденных при археологических раскопках в Национальном Крюгер-парке (Южная Африка). Радиоуглеродный анализ этих костей показал, что они принадлежат животным, погибшим от сибирской язвы более 200 лет назад [8]. Имеется предположение, что возбудитель сибирской язвы может быть активным через 1300 лет [9]. Так, в 1982 г. в одном из колхозов Пермской области внезапно заболела сибирской язвой корова. В процессе расследования выяснилось, что летом на берегу реки Шаква

археологи обнаружили древнее поселение. В ходе раскопок появилось предположение, что примерно в VII веке здесь свирепствовала какая-то болезнь, от которой погибло немало людей и животных. Оставшиеся в живых жители поселения сожгли свои дома и покинули эти места. Около раскопов постоянно паслось колхозное стадо. В пробах грунта оказались споры возбудителя сибирской язвы, которые почти тринадцать столетий спокойно дремали в глубинах земли [10].

Все сказанное свидетельствует о том, что за время нахождения в почве возбудитель длительно сохраняет не только жизнеспособность, но и вирулентность.

Считается доказанной возможность непосредственного заражения животных и людей от почвы. Инфицирование споровой формой *Bacillus anthracis* отмечалось при заражении от контаминированной почвы в 3–14% от общего числа заболеваний [11–13]. Риск заражения людей спорами *B. anthracis*, находящимися в почве, сохраняется и в современных условиях в результате хозяйственной профессиональной деятельности [3].

Почвенные очаги сибирской язвы имеют важное значение в эпидемиологии этой инфекции. В Чувашской Автономной Республике с 1955 по 1961 г. из числа людей, заболевших сибирской язвой, инфицирован через почву был каждый четвертый, а после 1961 г. заражения людей произошли через почву в половине случаев [6].

Потенциал инфекции поддерживается существованием множества почвенных очагов, которые проявляют себя в течение многих лет периодическими вспышками сибирской язвы среди сельскохозяйственных животных и людей.

На основании информации о всех известных за последние более чем 100 лет стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах в России создан «Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации» [13].

Всего в Российской Федерации за период 1900–2003 гг. зарегистрирована 36 091 локация стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов с почвенными очагами, в которых учтено 7940 сибиреязвенных скотомогильников, представляющих наибольшую угрозу биобезопасности. Скотомогильником (сибиреязвенным захоронением) считается место для долговременного захоронения трупов сельскохозяйственных и домашних животных, погибших или забитых вследствие заболевания сибирской язвой. Это территория, которая может быть причиной возникновения вспышки заболевания сибирской язвой. Причины такой вспышки могут быть самые различные – от прямого вмешательства человека до геоморфологических процессов [14]. Исходя из этого производится оценка потенциальной опасности скотомогильника, которая зависит от того, где именно и как был создан скотомогильник. Наименее опасны оформленные и зарегистрированные скотомогильники. Иначе обстоит дело со старыми или забытыми скотомогильниками, которые попадают в сферу хозяйственной деятельности человека или подвергаются природным ландшафтными изменениям (например, осыпание склонов, подмывание берегов рек, формирование оврагов и впадин).

К сожалению, на многих территориях до настоящего времени точно не известны все места гибели и захоронения

животных, погибших от сибирской язвы. Поэтому встречаются и неучтенные скотомогильники. Так, на основании паспортизации скотомогильников в Республике Бурятия выявлено 231 сибиреязвенное захоронение, из них всего лишь для 9 установлено точное местонахождение [15].

В 2000 г. в Тамбовской области источником заражения животных послужил разрытый при проведении земляных работ неучтенный скотомогильник, хотя ранее местность считалась благополучной по сибирской язве.

Таким образом, можно констатировать, что сибирская язва опасна по-прежнему, основными источниками заражения людей сибирской язвой являются больные животные или их трупы, а также инфицированная почва, которая служит естественной средой обитания и фактором самоподдержания популяции возбудителя во внешней среде.

Характерной особенностью сибирской язвы является возможность внезапной активизации инфекции. Примером может служить эпизоотия этой инфекции в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., неожиданно возникшая на фоне многих десятилетий полного благополучия [5].

Значительные трудности представляет обнаружение возбудителя сибирской язвы в почве, которая является одним из источников заражения. Так, Коронный А.В. [16] из 1000 образцов исследуемой почвы и воды, взятых из очагов сибирской язвы, выделил лишь 18 культур *B. anthracis*. С трудностью обнаружения сибиреязвенного микроба в почве мы столкнулись при исследовании проб почвы, взятых на месте старого скотомогильника, существующего более 75 лет на берегу Ивановского водохранилища в Конаковском районе Тверской области. Исторически известно, что в 1936 г. на указанной территории наблюдалась крупная вспышка сибирской язвы [17]. Плотность захоронений животных, павших от сибирской язвы в Конаковском районе, – 5–6 скотомогильников на каждые 3 км берега Ивановского водохранилища. Самыми опасными считаются скотомогильники около деревень Свердловлово и Дунина Гора.

В связи с вышесказанным **целью настоящей работы** было оценить опасность сибиреязвенных захоронений путем выделения из почвы и изучения свойств культур сибиреязвенного микроба.

Для генотипирования выделенных почвенных штаммов нами был использован метод многолокусного VNTR-типирования с использованием шести хромосомных (VrrA, VrrB1, VrrB2, VrrC1, VrrC2, Cg3) и двух плазмидных (PXO1(aat) и PXO2(at)) маркеров [18, 19]. В качестве контролей использовали сибиреязвенные штаммы и *Bacillus cereus* 504 из коллекции ГНЦ ПМБ.

Материалы и методы

Обследуемый участок был разделен на квадраты, и было отобрано 80 проб земли с различной глубины (1,5–2,0 м), так как именно на этом уровне в прошлом осуществлялось захоронение трупов животных. Для обнаружения и выделения возбудителя сибирской язвы использовали микробиологические (высев на LB-агар с полимиксином), биологические (заражение лабораторных животных) и генетические (полимеразная цепная реакция (ПЦР)) методы исследований [20].

Для исключения роста неспорных культур проводили термообработку почвенных взвесей при 83°C в течение 13 мин и затем высевали на агаровую среду по Луриа–Бертани (LB-агар) с полимиксином, а также на дифференциально-диагностические среды с фенолфталеинфосфатом натрия или с бромтимоловым синим. Это позволило нам сузить круг поиска возбудителя сибирской язвы.

В результате первичного анализа морфологии роста на агаровых средах было отобрано 90 подозрительных колоний. Культуры из всех колоний засеивали в бульонную питательную среду по Хоттингеру. После оценки характера их роста в жидкой среде осталось 20 подозрительных культур. В результате дополнительных исследований на основании комплекса признаков было отобрано 6 штаммов. На LB-агаре вырастали типичные по морфологии шероховатые колонии. По характеру роста в LB-бульоне выделенные штаммы можно разделить на три типа культур. Оценили способность штаммов продуцировать капсулу (на бикарбонатно-сывороточной среде по Green), лизабельность специфическими сибиреязвенными бактериофагами Гамма А-26 и Оболенск R1, чувствительность к ампициллину, гемолитическую активность и реакцию преципитации с сибиреязвенным γ -глобулином [21].

Спектры секретируемых почвенными штаммами белков изучали с помощью иммуноблоттинга с кроличьими моноспецифическими сыворотками, полученными нами ранее к отдельным компонентам сибиреязвенного токсина.

Молекулярно-генетическое типирование выделенных штаммов проводили с помощью ПЦР. В качестве контрольных использовали штаммы *B. anthracis* и близкородственного микроорганизма *B. cereus*. Из исследуемых и контрольных штаммов выделили ДНК и проверили в ПЦР с праймерами, разработанными Ramiisse et al. [19] для генома сибиреязвенного микроба – протективного антигена (pag), летального фактора (lef), отечного фактора (суа) генов плазмиды рХО1, капсульной субстанции (cap) генов плазмиды рХО2 и хромосомного маркера (Ba813). Для сравнения исследовали ДНК штаммов *B. anthracis* с различным гено- и фенотипами (81/1; 71/12; СТИ-1; СТИ-Rif4; 1; 10; 32; 193; Daccar) и 8 штаммов близкородственных бацилл.

Результаты и обсуждение

Полученные характеристики выделенных штаммов представлены в табл. 1.

Два штамма (П-1М и П-4о) обладали всеми типичными для возбудителя сибирской язвы характеристиками – типичный рост на агаровой питательной среде и в бульоне, лизабельность фагами Гамма и КВИЭВ, чувствительность к пенициллину (по тесту «жемчужного ожерелья»), образование зоны преципитации на агаре с сибиреязвенным γ -глобулином. Отсутствие капсулообразования на среде Green, вероятно, связано с их частичной аттенуацией в процессе длительного нахождения в почве. Три штамма, несмотря на типичный рост на агаровой среде, не лизировались фагами и были устойчивы к пенициллину.

Результаты молекулярно-генетического типирования выделенных штаммов представлены в табл. 2.

Как следует из приведенных результатов, только два из шести выделенных штаммов являются «полноценными»

Таблица 1. Биологические свойства штаммов, выделенных из почвы

Шифр штамма	Свойства штаммов					
	Проба с фагами	Зона ингибирования на среде с ампициллином, мм	Гемолиз на кровяном агаре	Проба с сибирезявленным глобулином	Морфология колоний на агаровой среде Green	Рост в LB-бульоне
П-1М	+	22	-	+	Шероховатые	Типичный
П-4о	+	10	-	+	Шероховатые	Типичный
П-4	+	3	+	±	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4ш	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4с	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-14	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон прозрачный

Таблица 2. Результаты постановки ПЦР с ДНК некоторых штаммов бацилл

Штамм	Результаты с праймерами				
	Ва813 152 п.н.	Саp264 п.н.	Lef385 п.н.	Суa546 п.н.	Раg747 п.н.
П-1М	+	+	+	+	+
П-4о	+	+	+	+	+
П-4	+	-	+	-	+
П-4ш	+	-	-	-	-
П-4с	+	-	-	-	-
П-14	+	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> 81/1	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> 71/12	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ-1	+	-	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ-Rif4	+	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> 10-атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> 32-атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> 193-атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> Daccar	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> 504	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 217	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 164	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 168	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-
<i>B. polymixa</i>	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	-	-	-	-	-

B. anthracis в генетическом отношении – это штаммы П-1 и П-4о (в ПЦР выявлены все пять видоспецифических ПЦР-фрагментов раg, lef, суa, саp, Ва813), что согласуется с характеристиками выделенных штаммов, приведенными выше.

Штамм П-4 можно отнести к атипичному бескапсульному варианту *B. anthracis*, сходному с атипичными штаммами *B. anthracis* 10, 32, 193 и Daccar, также лишенными гена отечного фактора. Штаммы П-4с, П-4ш и П-14 несли только один хромосомный маркер Ва813, который обнаруживается и у *B. cereus*, следовательно, их можно с уверенностью отнести к близкородственным штаммам.

По результатам изучения спектров секретируемых почвенными штаммами белков (данные не приведены) показано, что все три компонента токсина синтезируются только штаммами П-1М и П-4о, что подтверждает данные ПЦР.

Результаты определения величин переменных фрагментов по этим локусам приведены в табл. 3.

Из представленных данных видно, что выделенные из почвы штаммы П-1М и П-4о с типичными культурально-морфологическими признаками, чувствительные к пенициллину и сибирезявленному бактериофагу, являющиеся типичными штаммами *B. anthracis* по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами, укладываются также в схему VNTR-типирования, разработанную для *B. anthracis*. Полученные значения величин фрагментов по 8 локусам позволяют отнести штаммы П-1М и П-4о к подгруппе *B. anthracis* А3. Следовательно, из почвы старого скотомогильника нами выделены два типичных эпидемически значимых штамма *B. anthracis*, несущих генетические элементы, кодирующие синтез компонентов токсина и капсулы.

Штамм П-4, отличающийся по ряду признаков от типового, а именно: по характеру роста в жидкой питательной среде, по гемолизу эритроцитов и по слабой чувствительности к пенициллину, имеет шесть из восьми совпадающих

Таблица 3. Величины фрагментов vrr-областей штаммов, выделенных из сибирезявленного скотомогильника

Штамм	Величины фрагментов, п.о.							
	VrrA	VrrB1	VrrB2	VrrC1	VrrC2	Cg3	PXO1	PXO2
П-1М	313	228	164	613	532	153	133	135
П-4о	315	228	161	611	533	153	130	136
П-4	313	229	161	-	533	154	133	-
П-4ш	278	264	-	-	336	-	-	-
П-4с	285	264	163	-	312	-	-	-
П-14	294	265	164	-	324	-	-	-
81/1	313	230	161	609	600	152	135	136
1	324	230	162	617	601	153	136	137
71/12	315	230	161	611	527	153	135	136
СТИ-1	316	229	162	613	602	153	133	136
Daccar	298	229	161	496	472	156	134	144
10	315	230	160	613	599	156	136	136
32	312	230	161	-	528	155	133	136
193	310	229	163	673	585	-	-	136
<i>B. cereus</i> 504	282	266	164	-	308	-	130	-

с известными величинами VNTR-локусов, в частности, VrrA, VrrB1, VrrB2, VrrC2, Cg3, PХО1. Поскольку не амплифицировались фрагменты, соответствующие локусу VrrC1 и капсуле, то отнести штамм П-4 к какой-либо VNTR-подгруппе оказалось невозможным. Следовательно, нами выделен ранее не охарактеризованный атипичный штамм *B. anthracis*, не представляющий эпидемической опасности, но требующий дальнейшего детального изучения.

Для остальных штаммов – П-4ш, П-4с и П-14 – по величинам vrr-локусов получена картина, сходная с таковой для штамма *B. cereus* 504. Для уточнения полученных данных нами специально был отсекуен фрагмент рХО1-фрагмент штамма *B. cereus* 504.

Результаты секвенса фрагмента ДНК *B. cereus* полностью укладываются в классификацию, предложенную Р.Keim для *B. anthracis* [18]. Это может быть связано с очень высокой степенью гомологии генома, что отражает недавнюю эволюцию *B. anthracis* от родительской субгруппы *B. cereus*. Показано, что некоторые изоляты *B. cereus* содержат последовательности, сходные более чем с половиной последовательностей открытых рамок считывания плазмиды рХО1 *B. anthracis*, причем основная часть ДНК-фрагментов *B. cereus* имела сходство от 80 до 98%.

Совпадение данных по локусам VrrB2 и рХО1 *B. anthracis* и *B. cereus* значительно затруднило однозначную дифференциацию этих видов, тем не менее, поскольку по всем остальным локусам имелись значительные отличия от *B. anthracis*, штаммы П-4ш, П-4с и П-14 с большой степенью вероятности можно отнести к *B. cereus*.

Это еще одно свидетельство сложности процесса дифференциации бациллярных штаммов. С целью повышения эффективности типирования бацилл в настоящее время предлагаются различные комбинации методов в зависимости от поставленных задач, но, вследствие высокой генетической мономорфности сибиреязвенного микроба, мультилокусный VNTR-анализ может оказаться наиболее приемлемым для типирования *B. anthracis*.

Оценивая полученные данные по идентификации выделенных из старого скотомогильника бацилл, можно сделать вывод о том, что для точного подтверждения выделения возбудителя сибирской язвы по-прежнему необходимо проведение комплексных исследований – микробиологических, иммунобиологических и молекулярно-генетических. Микробиологический анализ показал присутствие в почве скотомогильника трех культур *B. anthracis* (П-1М, П-4, П-4с), обладающих всеми типичными для возбудителя сибирской язвы характеристиками – лизабельность фагами Гамма и К-ВИЭВ, чувствительность к пенициллину, типичный рост в бульоне. Эти данные были подтверждены результатами ПЦР с пятью праймерами к rag, lef, суа, сар, Ва 813, разработанными для генома сибиреязвенного микроба. Штамм П-4 лишен капсульной субстанции и имеет дефект токсина, поскольку лишен отечного фактора. Отсутствие капсулы при культивировании этих штаммов на среде Green, вероятно, связано с частичной аттенуацией за время нахождения в почве. Три другие штамма (П-4ш, П-4с и П-14) не лизировались фагами и были устойчивы к пенициллину. Они первично были отобраны по морфологии колоний и характеру роста в бульоне. Постановка ПЦР с ДНК этих штаммов по-

казала, что у них отсутствуют все ПЦР-фрагменты, кроме хромосомного маркера Ва813.

Дополнительные исследования выделенных штаммов с использованием мультилокусного VNTR-анализа позволили отнести выделенные штаммы П-1М и П-4с к подгруппе *B. anthracis* А3, выявить ранее не охарактеризованный атипичный штамм *B. anthracis* П-4 и отнести выделенные штаммы П-4ш, П-4с и П-14с с нетипичными для сибиреязвенного микроба свойствами к *B. cereus*.

Таким образом, из почвы скотомогильника были выделены три типа сибиреязвенных культур. Некоторые из них имели свойства, типичные для *B. anthracis*, другие отличались по ряду признаков. Это согласуется с имеющимися сведениями о выделении из объектов внешней среды, наряду с типичными штаммами, атипичных мутантов, значение которых в эпидемиологии и патогенезе сибирской язвы остается не ясным и требует изучения. Была показана принципиальная возможность использования комплексной методики для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

Почва скотомогильника была обработана 4%-м раствором формальдегида. Через 2 мес. отобрали пробы почвы и провели их микробиологический анализ. Несмотря на проведенную обработку, вновь были выделены два типичных сибиреязвенных штамма. Лишь после повторной обработки нам не удалось обнаружить возбудителя сибирской язвы.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Hugh-Jones ME. Quality of reports – OIE World Animal Health in 1993 and the 1993 FAO-OIE-WHO Animal Health Yearbook. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Sept.19-21, 1995. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1996;87:3-4.
2. Об усилении мероприятий, направленных на профилактику сибирской язвы в Российской Федерации. Постановление Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации №81 от 10.12.2014.
3. Симонова ЕГ, Картавая СА, Локтионова МН, Ладный ВИ. Эпидемиологическая опасность сибиреязвенных захоронений: теоретико-методологические аспекты. Медицина в Кузбассе. 2013;12(2):26-31.
4. Descotes IP, Joubert L. Reconversions epidemiologiques actuelles de la fièvre charbonneuse et opportunité de la reactualisation de la réglementation spéciale. Rev Med Vet. 1978;129(8-9):1209-21.
5. Попова АЮ, Демина ЮВ, Ежлова ЕБ, и др. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Под ред. Поповой АЮ, Куличенко АН. Ижевск: ООО «Принт-2»; 2017, 313 с.

6. Андронников ВА. Опыт организации мероприятий по профилактике сибирской язвы в Чувашии. В сб.: Вопросы эффективности противосибирезавенных мероприятий. Матер. Всесоюз. науч. симпозиума IX Пленарного заседания междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974, с. 18-20.
7. Turnbull PC, Hutson RA, Ward MJ, Jones MN, Quinn CP, Finnie NJ, et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. J Appl Bacteriol. 1992 Jan;72(1):21-8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04876.x
8. Van de Vos. The ecology of antrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11-13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:19-23.
9. Anon. Milzbrandvirus nach 1300 Jahren noch aktiv? Gesundheitspolitische Umschau. 1982;33:60.
10. Тамиранов А. Сибирская язва – истоки названия. LiveJournal [Электронный ресурс]. URL: <https://tamiranov.livejournal.com/352611.html> (дата обращения: 21.02.2022).
11. Артеменков МП. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по сибирской язве и меры борьбы с ней в Семипалатинской области Казахстана. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР. Сб. тез. докл. X Пленарного засед. Межведомств. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1978, с. 31-32.
12. Дранкин ДИ. Зоонозы (Болезни, передающиеся людям от животных). М.: Знание; 1983, 96 с.
13. Стройновский ФС. Случай сибирской язвы (*Pustula maligna*). Вестник общественной гигиены, судебной и практической медицины. 1906;4:504-508.
14. Николаенко ДВ. Скотомогильник как объект и предмет естественнонаучного исследования. Случай Украины. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;2:211-329.
15. Симонова ЕГ, Галкин ВВ, Локтионова МН, Ладный ВИ. Сибирезавенные скотомогильники на территории РФ и их биологическая безопасность. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010;4:23-6.
16. Коронный АВ. Развитие бацилл антракса в почве и процессы изменчивости их. Сб. науч. трудов Эстонской сельскохозяйственной академии. Т. 4. Тарту, 1958, с. 99-105.
17. Кноп АГ. Влияние антропогенного преобразования природы на почвенные очаги сибирской язвы. В сб.: Современные проблемы зоонозных инфекций. Тез. докл. Всесоюзной межведомственной конфер. Симферополь, 1981. М., 1981, с. 25-27.
18. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infect Genet Evol. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
19. Ramiisse V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996 Nov 15;145(1):9-16. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08548.x
20. Лабораторная диагностика сибирской язвы и идентификация *Bacillus anthracis*. Методические указания (Проект). Ставрополь, 2019, 70 с.
21. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН, и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. Учебно-методическое пособие. Под ред. Дятлова ИА. М.: «Династия»; 2021, 240 с.
2. On strengthening measures aimed at the prevention of anthrax in the Russian Federation. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation No 81 dated 10.12.2014. (In Russian).
3. Simonova EG, Kartavaya SA, Loktionova MN, Ladny VI. Epidemiological hazard of anthrax animal burials: theoretical and methodological aspects. Medicine in Kuzbass. 2013;12(2):26-31. (In Russian).
4. Descotes IP, Joubert L. Reversions epidemiologiques actuelles de la fièvre charbonneuse et opportunités de la reactualisation de la réglementation spéciale. Rev Med Vet. 1978;129(8-9):1209-21.
5. Popova AYU, Demina YuV, Ezhlova EB, et al. The experience of eliminating the outbreak of anthrax in Yamal in 2016. Edited by Popova AYU, Kulichenko AN. Izhevsk: «Print-2» Publ.; 2017, 313 p. (In Russian).
6. Андронников ВА. Опыт организации мероприятий по профилактике сибирской язвы в Чувашии. В сб.: Вопросы эффективности противосибирезавенных мероприятий. Матер. Всесоюз. науч. симпозиума IX Пленарного заседания междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974, с. 18-20.
7. Turnbull PC, Hutson RA, Ward MJ, Jones MN, Quinn CP, Finnie NJ, et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. J Appl Bacteriol. 1992 Jan;72(1):21-8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04876.x
8. Van de Vos. The ecology of antrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11-13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:19-23.
9. Anon. Milzbrandvirus nach 1300 Jahren noch aktiv? Gesundheitspolitische Umschau. 1982;33:60.
10. Тамиранов А. Anthrax – the origins of the name. LiveJournal [Электронный ресурс]. URL: <https://tamiranov.livejournal.com/352611.html> (accessed 21.02.2022). (In Russian).
11. Артеменков МП. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по сибирской язве и меры борьбы с ней в Семипалатинской области Казахстана. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР. Сб. тез. докл. X Пленарного засед. Межведомств. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1978, с. 31-32.
12. Дранкин ДИ. Зоонозы (Болезни, передающиеся людям от животных). М.: Знание; 1983, 96 с.
13. Стройновский ФС. Случай сибирской язвы (*Pustula maligna*). Вестник общественной гигиены, судебной и практической медицины. 1906;4:504-508. (In Russian).
14. Николаенко ДВ. Скотомогильник как объект и предмет естественнонаучного исследования. Случай Украины. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;2:211-329. (In Russian).
15. Симонова ЕГ, Галкин ВВ, Локтионова МН, Ладный ВИ. Anthrax cattle burial grounds in Russia and their biosafety. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2010;4:23-6. (In Russian).
16. Коронный АВ. The development of anthrax bacilli in the soil and the processes of their variability. Proceedings of the Estonian Agricultural Academy. Vol. 4. Tartu, 1958, pp. 99-105. (In Russian).
17. Кноп АГ. The influence of anthropogenic transformation of nature on soil foci of anthrax. In: Modern problems of zoonotic infections. Proceedings All-Union Interdepartmental Conference. Simferopol, 1981. Moscow, 1981, pp. 25-27. (In Russian).
18. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infect Genet Evol. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005

References

19. Ramise V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pX01 and pX02 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 1996 Nov 15;145(1):9-16. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08548.x
20. Laboratory diagnosis of anthrax and identification of *Bacillus anthracis*. Methodological guidelines (Project). Stavropol, 2019, 70 p. (In Russian).
21. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN, et al. Methods of studying the biological and molecular genetic properties of the causative agent of anthrax. Edited by Dyatlov IA. Moscow: "Dynasty" Publ.; 2021, 240 p. (In Russian).

Информация об авторах:

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Nina A. Shishkova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher Laboratory of Anthrax Microbiology Department of Particularly dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Новый метод может устранить устойчивость к антибиотикам у смертельных бактерий

Группа исследователей из Техасского университета в Остине нашла новый способ ослабить устойчивость к антибиотикам бактерий, вызывающих болезни человека, в том числе кишечной палочки, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Команда сделала бактерии снова уязвимыми для антибиотиков, ингибируя определенный белок, который управляет формированием устойчивости у бактерий.

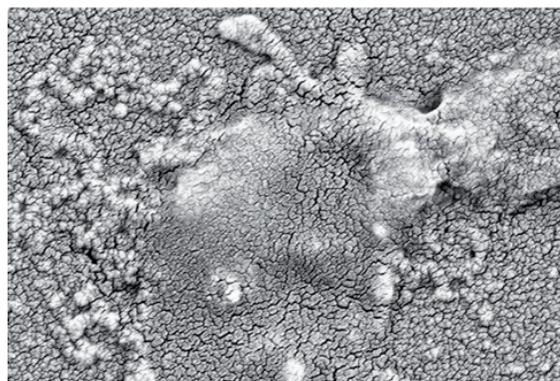
Январское исследование, проведенное другой командой в *The Lancet*, показало, что устойчивость к противомикробным препаратам является непосредственной причиной по меньшей мере 1,27 миллиона смертей во всем мире в 2019 году, что делает устойчивость к антибиотикам одной из основных причин смерти в мире.

Устойчивые к антибиотикам бактерии имеют в своем арсенале множество различных белков, которые нейтрализуют антибиотики. Для правильного функционирования эти резистентные белки должны иметь правильную форму. Исследователи обнаружили, что еще один белок, называемый DsbA, помогает сворачивать белки резистентности в такие формы.

Для своего экспериментального исследования, которое недавно было опубликовано в журнале *eLife*, ученые ингибировали DsbA, используя химические вещества, которые нельзя использовать непосредственно у пациентов-людей. Теперь команда планирует работать над созданием ингибиторов, которые могут обеспечить тот же результат и безопасно использоваться на людях.

Их цель – объединить ингибитор DsbA с существующими антибиотиками, чтобы восстановить способность препаратов убивать бактерии. Поскольку он нацелен на механизм, который помогает собирать устойчивые к антибиотикам белки у опасных бактерий, этот подход сделает несколько типов белков, критически важных для устойчивости, неэффективными, лишив их способности сворачиваться или создавать дисульфидные связи.

Результаты показывают, что, воздействуя на образование дисульфидных связей и укладку белков, можно обратить вспять устойчивость к антибиотикам у нескольких основных патогенов и механизмов устойчивости. Это означает, что разработка клинически полезных ингибиторов DsbA в будущем может предложить новый способ лечения резистентности. инфекций с использованием доступных в настоящее время антибиотиков.



New method can disarm antibiotic resistance in deadly bacteria [Электронный ресурс]. URL: <https://phys.org/news/2022-02-method-antibiotic-resistance-deadly-bacteria.html> (дата обращения: 28.02.2022).

Аффинные теги для очистки рекомбинантных белков

Е.М.Мазурина, М.Е.Платонов, А.С.Трунякова, С.В.Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

К настоящему времени разработано множество различных тегов для очистки белков, в том числе короткие пептиды, эпитопы, свернутые белковые домены, теги для нехроматографического выделения, а также сложные многофункциональные теги с оптимизированными возможностями. Генно-инженерные теги способствуют эффективной очистке рекомбинантных белков с высоким выходом и достижением значительной чистоты за несколько стандартных этапов выделения. Хотя для удаления тегов из целевого продукта по-прежнему широко используется отщепление с помощью протеаз, более удобной альтернативой становятся новые методы самоотщепления. В настоящем обзоре обсуждаются современные тенденции в выделении и очистке рекомбинантных белков с помощью технологии тегов, а также основные проблемы данной области.

Ключевые слова: рекомбинантные белки, выделение и очистка, теги

Для цитирования: Мазурина Е.М., Платонов М.Е., Трунякова А.С., Дентовская С.В. Аффинные теги для очистки рекомбинантных белков. Бактериология. 2022; 7(1): 47–54. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-47-54

Affinity tags for recombinant protein purification

E.M.Mazurina, M.E.Platonov, A.S.Trunyakova, S.V.Dentovskaya

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

To the present, many different protein purification tags have been developed, including short peptides, epitopes, folded protein domains, non-chromatographic selection tags, and complex multi-functional tags with optimized capabilities. Genetically engineered tags facilitate the efficient purification of recombinant proteins with high yields and achieving significant purity in a few standard isolation steps. Although protease-assisted cleavage is still widely used to remove tags from the target product, newer self-cleavage methods are emerging as a more convenient alternative. This review discusses current trends in the isolation and purification of recombinant proteins using tag technology, as well as the main problems in this area.

Key words: recombinant proteins, protein purification, affinity tags

For citation: Mazurina E.M., Platonov M.E., Trunyakova A.S., Dentovskaya S.V. Affinity tags for recombinant protein purification. Bacteriology. 2022; 7(1): 47–54. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-47-54

Несмотря на множество областей практического применения слитых генетических конструкций, наиболее распространенным, возможно, является использование тегов для стандартизации очистки белков-мишеней [1]. Теги обычно слиты с N- или C-концом целевого белка и позволяют селективно захватывать и выделять белок-партнер посредством образования ассоциации со специфической аффинной смолой, а также путем высокоселективной тег-зависимой преципитации или агрегации (рис. 1). Многие теги также выполняют дополнительные, не связанные с очисткой функции, такие как облегчение обнаружения целе-

вого белка или улучшение его растворимости [2]. В случаях, когда требуется получить нативный немаркированный белок, тег обычно удаляют после очистки мишени с помощью различных методов.

Хотя методы на основе тегов используются в лабораториях по всему миру в течение десятилетий, до настоящего времени еще не идентифицированы универсальные теги, применимые к любому белку, экспрессируемому в любом хозяине.

В большинстве случаев идентификация оптимального тега для данной комбинации хозяин–мишень идет путем проб и ошибок, а для некоторых целевых белков не обнару-

Для корреспонденции:

Мазурина Елизавета Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0117
E-mail: elizavetamazurina99@yandex.ru

Статья поступила 16.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Elizaveta M. Mazurina, Junior Researcher of Laboratory For Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0117
E-mail: elizavetamazurina99@yandex.ru

The article was received 16.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

жили эффективных тегов. Указанные ограничения способствуют продолжению разработок, которые в последние несколько лет привели к эффективным инновациям. Хотя, вероятно, создание универсальной стратегии очистки нереалистично, сохраняется необходимость расширения спектра белков, которые могут быть очищены с помощью тегов, при одновременном упрощении выбора подходящего метода для каждой новой мишени. Для достижения этих целей исследователи все чаще используют составные теги, включающие несколько небольших доменов, продолжая при этом разрабатывать однодоменные теги с расширенными возможностями. Многие новые теги при выделении белка способны прикрепляться к недорогим субстратам, что наряду с разработкой подходов по их удалению ведет к росту экономичности процесса. Все это обеспечивает повышение экспрессии, чистоты и упрощение обнаружения широкого диапазона слитых продуктов, а также удешевление удаления тегов с помощью простого самоотщепления или обычных протеолитических методов. В настоящем обзоре обсуждаются основные классы тегов, созданных для выделения и очистки рекомбинантных белков, и рассмотрены основные направления их дальнейшей разработки (таблица).

Популярные теги

Несомненно, наиболее часто для очистки белков используют полигистидин-тег (His_n-тег) [3], основными преимуществами которого являются небольшой размер, дешевизна использования и минимальное влияние на структуру и функцию целевого белка либо отсутствие всякого влияния [4]. Небольшой размер тега позволяет добавлять его к любому концу целевого белка, для его функционирования не требуется специфическая

складка, что повышает надежность тега для всех основных систем экспрессии. Несколько коммерческих векторов экспрессии доступны для белков с His-тегами. Для обнаружения подобных белков с помощью иммуноанализа существуют анти-His-антитела. Кроме того, His-тег может функционировать в нативных или денатурирующих условиях, что позволяет использовать его в протоколах рефолдинга белков [5]. His-тег успешно применяют при очистке растворимых мембранных белков, которые стабилизируются липидами или детергентами [6–8]. Действительно, уникальное сочетание силы и надежности сделало His-тег повсеместно используемым в исследованиях, не требующих экспрессии или очистки нативного немаркированного белкового продукта.

Несмотря на преимущества, использование His-тегов имеет и ряд ограничений, наиболее значимым из которых является возможность совместного выделения белков-загрязнителей с белками-мишенями, меченными остатками полигистидина.

Удаление загрязняющих веществ требует значительной оптимизации процесса выделения [9]. Недавно сконструированный штамм *Escherichia coli* LOBSTR (Low Background Strain) успешно используют для устранения из целевого продукта наиболее распространенных загрязняющих белков клетки-хозяина [10]. В некоторых случаях His-тег может мешать правильному фолдингу и активности целевого белка [11–13] и несовместим с секрецией в экспрессирующих клетках *Streptomyces* [14]. Кроме того, His-тег, как правило, не обеспечивает правильного фолдинга нерастворимых белков, поэтому его обычно добавляют к доменам, увеличивающим растворимость.

Некоторые из проблем, связанных с His-тегами, можно решить за счет использования небольших эпитопных тегов,

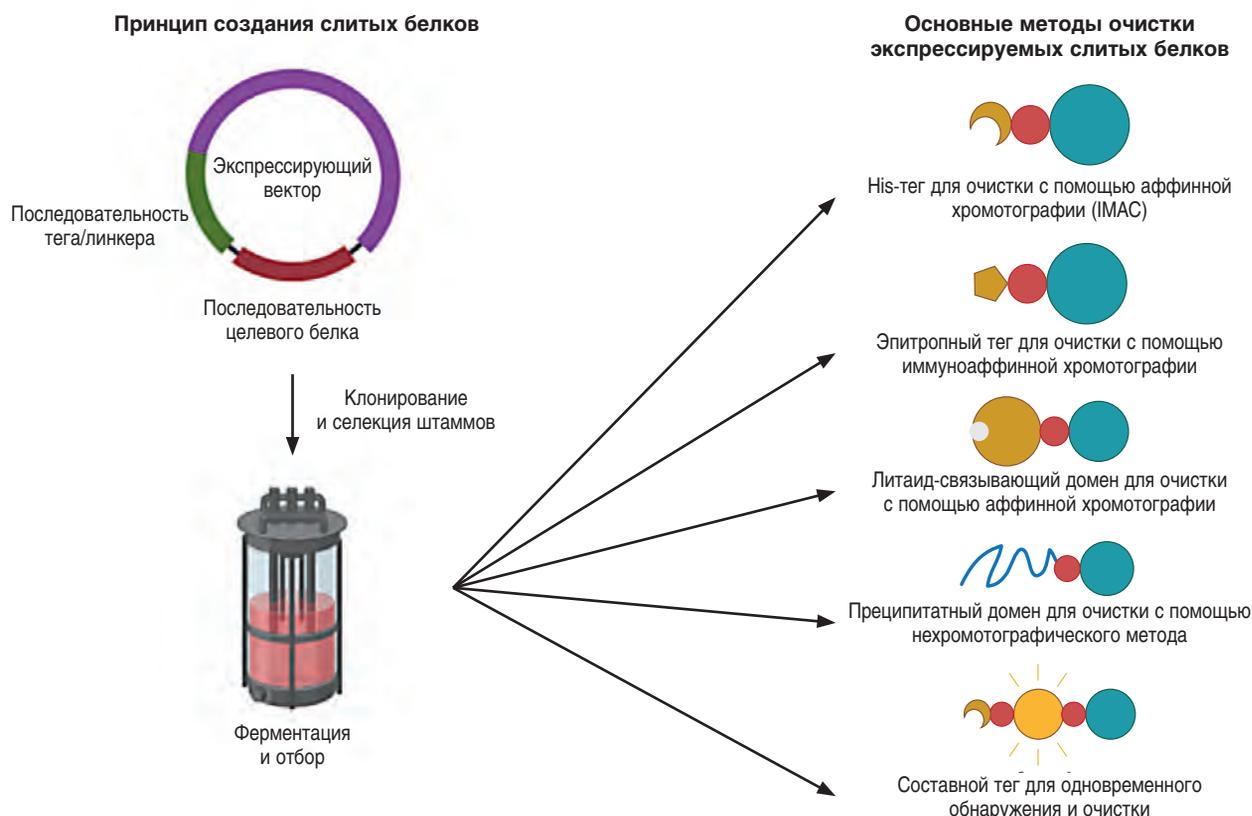


Рис. 1. Схематическое изображение основных стратегий клонирования рекомбинантных белков и часто используемых способов очистки.

наиболее широко признанными из которых являются FLAG, с-Мус и HA [15, 16]. Размер этих тегов обычно составляет 8–12 аминокислот, они прочно и специфично связываются с соответствующими иммуоаффинными смолами [17]. Небольшой размер позволяет им сохранять многие преимущества His-тега, обеспечивая при этом превосходную чистоту и извлечение слитой мишени. Теги также совместимы практически с любым хозяином для экспрессии и обеспечивают обнаружение с помощью иммуоаффинных методов с высокой чувствительностью, что делает их особенно привлекательными в случаях, когда трудно добиться повышения экспрессии целевого белка и удаление тега не требуется [18–20]. Несомненно, наиболее значительным недостатком использования небольших эпитопных тегов является высокая стоимость, поскольку коммерчески доступные иммуоаффинные смолы на несколько порядков дороже, чем большинство аффинных смол на основе лигандов. Таким образом,

удобство и селективность этих тегов делают их отличным выбором для очень узкой области применения, таких как тандемная аффинная очистка и некоторые структурные исследования. Однако для крупномасштабных экспериментов они достаточно дороги.

Третий основной класс обычных аффинных тегов включает теги лиганд-связывающего домена. Эти теги обычно намного больше, чем His-теги и эпитоп-теги, и состоят из полностью свернутых белковых доменов с высокоспецифичным сродством к низкомолекулярным лигандам, иммобилизованным на коммерчески доступных аффинных смолах. Двумя наиболее широко известными и часто используемыми тегами являются мальтозо-связывающий домен (Maltose Binding Domain/MBD) и глутатион-S-трансфераза (Glutathion S-Transferase/GST), которые не только усиливают экспрессию в микробных организмах-хозяевах, но также могут увеличивать растворимость белков-партнеров по слиянию [1,

Таблица. Основные классы тегов, используемых для выделения и очистки рекомбинантных белков

Тип тега	Пример	Преимущества	Ограничения	Ссылки
 His-тег	His _n	Минимальное влияние на экспрессию и сворачивание целевого белка; доступность коммерческих систем; хорошо зарекомендовал себя за время использования	Возможность совместной очистки загрязняющих веществ; может оказывать влияние на целевую функцию белка	[1, 3, 10, 28, 43, 63–66]
 Эпитопный тег	FLAG с-Мус GM-CSF Twin StrepII	Минимальное воздействие на целевой белок; исключительная чистота; кодируется праймером для ПЦП; обеспечивает иммунодетекцию	Очень дорогие смолы; ограниченность повторного использования	[15, 67] [15] [68] [69]
 Лиганд-связывающий домен	MBP GST Крахмал Фторопатит Диатомит βGRP	Может повысить растворимость целевого белка; обеспечивает высокоспецифичное связывание; менее дорогие смолы; возможно расщепление на колонке	Может снизить выход экспрессии; может выщелачиваться из колонки	[4, 45, 70] [4, 64] [35] [36] [38] [37]
 Преципитатный домен	ELP RTX ELK16 Fh8 4AaCter PagP	Недороги в использовании; нехроматографический метод выделения; высокие результаты экспрессии с тегами агрегации	Теги с преципитирующим доменом обычно имеют большой размер; для тегов, используемых для агрегации, могут потребоваться протоколы рефолдинга белков	[58, 59, 71, 72] [73] [74,75] [76] [77] [78, 79]
 Составной тег для обнаружения и очистки	eGFP Neme PYP	Прямое визуальное наблюдение за целевым белком; может быть очень количественным; отлично подходит для выявления неисправностей	Теги большего размера могут мешать экспрессии	[9, 80] [32, 49] [33]
 Тег растворимости и связывания	NusA SUMO Trx XTEN FATT	Могут повысить растворимость мишени во время экспрессии; может помочь в рефолдинге мишени при необходимости	Большинство из них имеют большие размеры и могут снизить целевой выход	[15, 22] [24-27, 28, 31] [47, 48, 81] [82] [39]

His_n – полигистидин; MBP – maltose-binding protein; GST – glutathione S-transferase-tag; FLAG-tag (8 amino acids); GM-CSF – granulocyte and macrophage-colony stimulating factor; βGRP – β-1,3-glucan recognition protein; ELP – elastin-like protein; RTX – repeat-in-toxin; ELK16 – self-assembling peptide; PagP – β-barrel membrane protein; eGFP – green fluorescent protein; PYP – photoactive yellow protein; NusA – hydrophilic tags, such as transcription termination anti-termination factor; SUMO – small ubiquitin like modifier protein; Trx – thioredoxin; FATT – flag-acidic-target.

21]. Существенными недостатками этих тегов являются их относительно большой размер и, как следствие, воздействие на целевые белки, что иногда требует их удаления. Данные теги также могут снизить общий выход более мелких белков-партнеров из-за высоких метаболических требований при синтезе белка.

Некоторые теги не применяют напрямую в каких-либо методах очистки, но обеспечивают улучшение фолдинга или обнаружение целевого белка. Например, слияние с NusA может повысить растворимость мишени [22], тогда как слияние с тиредоксином (thioredoxin/Trx) может способствовать образованию правильных дисульфидных связей в белках с множественными остатками цистеина [23]. Тег SUMO (small ubiquitin-related modifier – малый модификатор, связанный с убиквитином) также используют для повышения экспрессии и фолдинга рекомбинантных белков в прокариотических и эукариотических хозяевах [24–26]. Тег SUMO особенно привлекателен из-за своего небольшого размера и доступности высокоспецифичной протеазы SUMO для его удаления, и по этим причинам его часто комбинируют с рядом традиционных тегов в различных конфигурациях [27–31]. В то время как некоторые из тегов улучшают экспрессию слитых белков-партнеров, другие обеспечивают прямое визуальное отслеживание целевого белка во время экспрессии и очистки. Например, небольшие гемсвязывающие белки и мотивы придают слитой мишени ярко-красный цвет [32]. В этих же целях используют флуоресцентные и хромогенные белки [33, 34]. Хотя эти теги не всегда способствуют очистке целевого продукта, они часто помогают в устранении неполадок и оптимизации всего процесса.

Теги для очистки, фолдинга и детекции

Существуют теги, разработанные для недорогих субстратов, которые можно использовать при нехроматографических условиях, что делает их экономичными для крупномасштабных методов выделения в простых лабораторных условиях. Одним из наиболее многообещающих является крахмал-связывающий домен-тег (starch-binding domain/SBD), прочно и специфично связывающийся с сырым кукурузным крахмалом, а также с множеством других растительных крахмалов [35]. По сравнению с His-тегом SBD-тег позволяет получить высокоочищенный белок за одну стадию аффинной очистки, основанной на простом центрифугировании. Кроме того, крахмал недорогой, возобновляемый и биоразлагаемый, что предполагает использование этого метода для различных продуктов в больших масштабах.

Недавно были разработаны три дополнительных тега, которые связываются с недорогими аффинными субстратами. К ним относятся гептамерный тег, связывающийся с керамическим фторапатитом [36], состоящий из 112 аминокислотных остатков белок узнавания β -1,3-глюкана тутового шелкопряда, который связывается с недорогим курдланом [37], и 70-аминокислотный сегмент рибосомного белка L2 *E. coli*, который связывается с диатомовой землей [38]. Все три тега продемонстрировали эффективность, аналогичную обычным тегам при получении чистых белковых продуктов, и могут использоваться с недорогими базовыми материалами. Этот аспект не только способствует более низкой цене аффинных субстратов, но также устраняет риск вымывания лигандов из смолы в очищенный целевой белок.

Особое внимание привлекает тег Flag-Acidic-Target/FATT [39], состоящий из модуля тега Flag, опосредующего легкое обнаружение, вместе с гиперацидным сегментом внеклеточной области белка-предшественника амилоида человека (amyloid precursor protein/APP). Гиперацидный сегмент хорошо экспрессируется в *E. coli* и, благодаря высокому заряду, может быть легко очищен в одну стадию на обычной смоле для анионообменной хроматографии. Кроме того, было показано, что данный тег способствует правильному фолдингу слитых белков-мишеней во время экспрессии и может обеспечить правильный рефолдинг неправильно свернутых белков, содержащих дисульфидные связи. Предполагается, что эти возможности обеспечиваются неупорядоченной структурой гиперацидного сегмента FATT, который действует как щитообразный неспецифический шаперон для целевого белка во время экспрессии или рефолдинга *in vitro*.

Составные теги

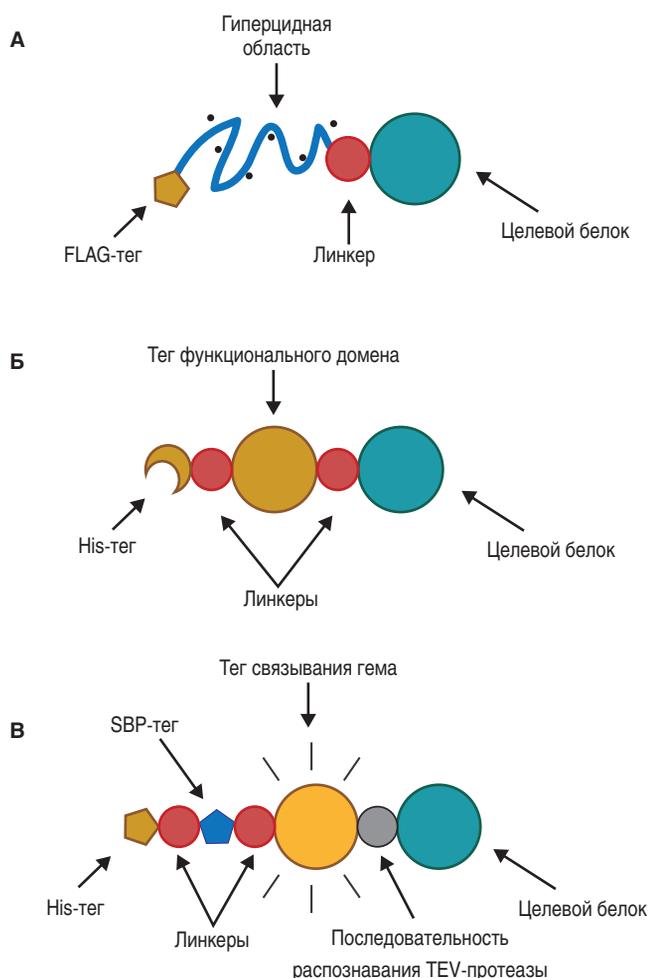


Рис. 2. Строение некоторых составных тегов. А – FATT-тег, состоящий из FLAG-тега для простого обнаружения и гиперацидного сегмента белка-предшественника амилоида человека [39]; Б – многофункциональный белок, меченный His, который включает дополнительный домен для улучшения экспрессии или количественного обнаружения. По крайней мере в одном случае His-метка используется главным образом как способ легкого удаления расщепленного функционального домена после очистки мишени; В – «Мультитег», который объединяет две метки для очистки с удобным доменом для обнаружения и последовательностью распознавания для протеазы [49].

Сложные составные теги в настоящее время обычно конструируются из нескольких связанных доменов, где различные комбинации могут обеспечивать высокоэффективные методы очистки, а также дополнительные функции, связанные с экспрессией и обнаружением мишени (рис. 2). Различные составные теги позволили охарактеризовать белок-белковые взаимодействия с помощью тандемной аффинной очистки (tandem affinity purification/TAP) и масс-спектрометрии [40–42], и эти мощные методы в настоящее время используются для очистки рекомбинантных белков-мишеней для структурных исследований.

Простейшим примером составного тега является комбинация тега для очистки белка, например His-тега, с функциональным доменом, таким как NusA-тег, повышающим растворимость [22]. Данный составной тег обеспечивает повышенную экспрессию и растворимость мишени, а также простой метод очистки и является типичным для первоначальной стратегии, используемой для получения неохарактеризованных мишеней в ранних этапах исследования. Дополнительные примеры бинарных меток включают CHiC-тег (His-Choline-связывающий домен – His-Choline binding domain) для двух методов очистки [43]; His-MBD для улучшенной экспрессии растворимых веществ и/или методов очистки [44, 45]; His-Trx для правильного образования дисульфидной связи и для упрощения удаления расщепленного тега Trx [46–48] и His-GFP для простого мониторинга и оптимизации экспрессии и очистки у *Saccharomyces* [9]. Более современным бинарным тегом теперь является тег SUMO, который может значительно увеличивать растворимую экспрессию целевых белков в различных хозяевах [27–30].

Последний, несколько более сложный пример – недавно опубликованный метод «Мультитег», основанный на четырехкомпонентном составном теге. В частности, этот тег включает в себя тег His₁₀, стрептавидин-связывающий пептид (streptavidin-binding peptide/SBP), гем-связывающий домен и последовательность протеазы TEV для удаления тега [49].

Теги His и SBP обеспечивают модернизированные методы очистки, а домен связывания гема позволяет просто визуально отслеживать и количественно определять целевой белок в процессе. Примечательно, что тег удаляется протеазой TEV, меченой SBP, таким образом удаляя тег и протеазу за одну операцию. Было показано, что эта метка эффективна для доставки высокоочищенной ДНК-полимеразы *Pfu* и белка, взаимодействующего с Myosin-VIIa и Rab (MyRIP – Myosin-VIIa and Rab-Interacting protein), и, вероятно, может иметь общее применение для дополнительных мишеней. Примечательно, что этот высокофункциональный тег имеет молекулярную массу всего 23 кДа, или чуть более половины молекулярной массы обычно используемого тега MBD.

Сочетание функции и размера делает этот тег очень привлекательным для методов среднего масштаба производства, а увеличивающаяся простота методов рекомбинантной ДНК способствует быстрому созданию прототипов новых конструкций. Что наиболее важно, растущая доступность небольших функциональных доменов неизбежно будет способствовать созданию дополнительных сложных и высокофункциональных тегов и будет продолжать увеличивать популярность составных тегов в будущем.

Методы удаления тегов

Во многих случаях теги, используемые для экспрессии и очистки целевого белка, должны быть удалены, прежде чем белок может быть охарактеризован или применен. Обычные методы включают удаление тегов путем добавления высокоспецифичных эндопептидаз, где целевая последовательность, узнаваемая эндопептидазой, встраивается в гибридный белок между тегом и мишенью [15]. Исследования базовых стратегий удаления тегов привели к нескольким недавним добавлениям, и все большей тенденцией является отщепление целевого белка на колонке непосредственно от иммобилизованного тега, часто с использованием иммобилизованной протеазы [49].

Значительные исследования были сосредоточены на идентификации более быстрых и более специфичных эндопептидаз для удаления тегов. Успешные результаты включают группу из четырех высокоспецифичных ферментов, применяемых в последовательной сборке белковых комплексов [50], а также устойчивую к детергентам протеазу вируса Западного Нила, используемую для отщепления тегов от мембранных белков, стабилизированных детергентом [51]. Особенно интересным примером является описанная глутамат-специфическая эндопептидаза из *Bacillus licheniformis* (протеаза GSE-BL – glutamate-specific endopeptidase), которая, как было показано, за 15 мин расщепляет до более чем 99% мишени в физиологических условиях [52].

Помимо новых протеолитических ферментов, в последние 20 лет используют способность к саморасщеплению [53, 54]. Первые из них основаны на самосплайсинговых интеинах, преобразующихся в саморасщепляющиеся белковые элементы [55–57]. Высокоэффективный метод очистки был создан путем объединения интеинов с тегом обратимо преципитирующегося эластиноподобного белка (elastin-like protein/ELP) [58–61]. Основные недостатки интеинов включают неконтролируемое расщепление во время экспрессии меченой мишени и необходимость в восстанавливающих агентах для запуска реакции расщепления на N-конце мишени.

Проблемы с преждевременным расщеплением интеинов были частично решены благодаря недавней разработке природных и сконструированных интеинов, которые неактивны при экспрессии в виде отдельных сегментов, но могут быть активированы после завершения протокола очистки. Особенно многообещающим воплощением этой стратегии является система сверхбыстрой очистки белка без тегов (SIRP – Split Intein Mediated Ultra-Rapid Purification of Tagless Protein), опосредованная расщепленным интеином, которая включает сборку и быстрое расщепление природного интеина *DnaE Nostoc punctiforme* в присутствии дитиотрейтола [62]. Было показано, что эта система полностью устраняет преждевременное расщепление целевого белка во время экспрессии, но обеспечивает почти полное удаление тега менее чем за 30 мин при комнатной температуре после запуска реакции расщепления. Кроме того, сегмент интеина, который присоединен к белку-мишени, довольно мал и, таким образом, оказывает ограниченное влияние на растворимость и экспрессию мишени. По этим причинам этот интеин является одним из наиболее многообещающих для удаления тегов и, вероятно, впоследствии будет объединен с множеством тегов для очистки, обнаружения и экспрессии в будущих системах.

Заключение

Всесторонний обзор тегов и методов удаления тегов будет включать множество лиганд-связывающих доменов, эпитопов, тегов преципитации и агрегации, а также около дюжины различных разновидностей His-тега. Эти теги можно комбинировать с более чем дюжиной методов удаления тегов, используемых в бесчисленных механических конфигурациях на целевых белках всех форм и размеров. В конечном счете легкость, с которой можно конструировать, модифицировать, комбинировать, рекомбинировать и расщеплять теги, привела к появлению буквально тысяч потенциальных методов очистки одного белка. Тем не менее, несмотря на это огромное разнообразие, по-настоящему универсального метода тегов не разработано. Более того, многие белки и некоторые классы белков упорно сопротивляются даже самым творческим и тщательно спланированным стратегиям. Эти разочарования привели к неустанным исследованиям в этой области, где большинство открытий обеспечивают лишь постепенный прогресс по сравнению с установленными методами. Наиболее значительными достижениями последних нескольких лет, вероятно, могли бы стать широко распространенное в настоящее время использование тега SUMO для улучшения экспрессии и растворимости рекомбинантных белков, а также разработка ряда новых методов удаления тегов. Расщепление тегов на колонке стало обычным делом, и в настоящее время коммерчески доступны несколько конфигураций. Методы самоотщепляющихся тегов продолжают развиваться и обещают распространить методы аффинных тегов на крупномасштабные производственные процессы. Несколько популярных протеазных ферментов теперь можно производить в рекомбинантной *E. coli*, что существенно снижает их стоимость и увеличивает доступность. В сочетании с простыми и недорогими тегами для осаждения эти достижения обещают демократизировать использование аффинных методов очистки белков, делая их доступными для гораздо более широкого сегмента научного сообщества.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

- Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J*. 2012 May;7(5):620-34. DOI: 10.1002/biot.201100155
- Walls D, Loughran ST. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification. *Methods Mol Biol*. 2011;681:151-75. DOI: 10.1007/978-1-60761-913-0_9
- Kuo WH, Chase HA. Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnol Lett*. 2011 Jun;33(6):1075-84. DOI: 10.1007/s10529-011-0554-3
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif*. 2005 May;41(1):98-105. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.019
- Dashivets T, Wood N, Hergersberg C, Buchner J, Haslbeck M. Rapid matrix-assisted refolding of histidine-tagged proteins. *Chembiochem*. 2009 Mar 23;10(5):869-76. DOI: 10.1002/cbic.200800697
- Periasamy A, Shadiac N, Amalraj A, Garajová S, Nagarajan Y, Waters S, et al. Cell-free protein synthesis of membrane (1,3)- β -d-glucan (curdian) synthase: co-translational insertion in liposomes and reconstitution in nanodiscs. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Feb;1828(2):743-57. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.10.003
- Hsu MF, Yu TF, Chou CC, Fu HY, Yang CS, Wang AH. Using *Haloarcula marismortui* bacteriorhodopsin as a fusion tag for enhancing and visible expression of integral membrane proteins in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2013;8(2):e56363. DOI: 10.1371/journal.pone.0056363
- Carocchia KE, Estephan R, Cohen LS, Arshava B, Hauser M, Zerbe O, et al. Expression and biophysical analysis of a triple-transmembrane domain-containing fragment from a yeast G protein-coupled receptor. *Biopolymers*. 2011;96(6):757-71. DOI: 10.1002/bip.21614
- Antaloae AV, Montigny C, le Maire M, Watson KA, Sørensen TL. Optimisation of recombinant production of active human cardiac SERCA2a ATPase. *PLoS One*. 2013 Aug 12;8(8):e71842. doi: 10.1371/journal.pone.0071842.
- Andersen KR, Leksa NC, Schwartz TU. Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins*. 2013 Nov;81(11):1857-61. DOI: 10.1002/prot.24364
- Fukushima M, Iiyama K, Yamashita J, Furue M, Tsuji G, Imanishi S, Mon H, Lee JM, Kusakabe T. Production of small antibacterial peptides using silkworm-baculovirus protein expression system. *Prep Biochem Biotechnol*. 2013;43(6):565-76. DOI: 10.1080/10826068.2012.762717
- Nakatani K, Ishikawa H, Aono S, Mizutani Y. Heme-binding properties of heme detoxification protein from *Plasmodium falciparum*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 4;439(4):477-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.100
- Horchani H, Fendri A, Louati H, Sayari A, Gargouri Y, Verger R. Purification, biochemical and kinetic properties of recombinant *Staphylococcus aureus* lipase. *Methods Mol Biol*. 2012;861:267-82. DOI: 10.1007/978-1-61779-600-5_16
- Ayala JC, Pimienta E, Rodríguez C, Anné J, Vallín C, Milanés MT, et al. Use of Strep-tag II for rapid detection and purification of *Mycobacterium tuberculosis* recombinant antigens secreted by *Streptomyces lividans*. *J Microbiol Methods*. 2013 Sep;94(3):192-8. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.004
- Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003 Jan;60(5):523-33. DOI: 10.1007/s00253-002-1158-6
- Kelman Z, Yao N, O'Donnell M. *Escherichia coli* expression vectors containing a protein kinase recognition motif, His6-tag and hemagglutinin epitope. *Gene*. 1995 Dec 1;166(1):177-8. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00556-7
- Fritze CE, Anderson TR. Epitope tagging: general method for tracking recombinant proteins. *Methods Enzymol*. 2000;327:3-16. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)27263-7
- Siegmund M, Richter F, Seifert O, Unverdorben F, Kontermann RE. Expression and purification of recombinant antibody formats and antibody fusion proteins. *Methods Mol Biol*. 2014;1131:273-95. DOI: 10.1007/978-1-62703-992-5_18
- Cheng L, Sage EH, Yan Q. SPARC fusion protein induces cellular adhesive signaling. *PLoS One*. 2013;8(1):e53202. DOI: 10.1371/journal.pone.0053202
- Stead CM, Omsland A, Beare PA, Sandoz KM, Heinzen RA. Sec-mediated secretion by *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol*. 2013 Oct 5;13:222. DOI: 10.1186/1471-2180-13-222
- Chatterjee DK, Esposito D. Enhanced soluble protein expression using two new fusion tags. *Protein Expr Purif*. 2006 Mar;46(1):122-9. DOI: 10.1016/j.pep.2005.07.028

22. Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 1999 Nov 20;65(4):382-8.
23. Tucker J, Grisshammer R. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J*. 1996 Aug 1;317 (Pt 3)(Pt 3):891-9. DOI: 10.1042/bj3170891
24. Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y, Lim P, Zuo X, Butt TR. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci*. 2006 Jan;15(1):182-9. DOI: 10.1110/ps.051812706
25. Peroutka Iii RJ, Orcutt SJ, Strickler JE, Butt TR. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. *Methods Mol Biol*. 2011;705:15-30. DOI: 10.1007/978-1-61737-967-3_2
26. Zuo X, Li S, Hall J, Mattern MR, Tran H, Shoo J, Tan R, Weiss SR, Butt TR. Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. *J Struct Funct Genomics*. 2005;6(2-3):103-11. DOI: 10.1007/s10969-005-2664-4
27. Zhang J, Ma L, Zhang SQ. Expression and purification of soluble human APRIL in *Escherichia coli* using ELP-SUMO tag. *Protein Expr Purif*. 2014 Mar;95:177-81. DOI: 10.1016/j.pep.2013.12.013
28. Liew OW, Ang CX, Peh YP, Chong PC, Ng YX, Hwang LA, et al. A His6-SUMO-eXact tag for producing human prepro-urocortin 2 in *Escherichia coli* for raising monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2014 Jan 31;403(1-2):37-51. DOI: 10.1016/j.jim.2013.11.015
29. Lu W, Cai X, Gu Z, Huang Y, Xia B, Cao P. Production and characterization of hirudin variant-1 by SUMO fusion technology in *E. coli*. *Mol Biotechnol*. 2013 Jan;53(1):41-8. DOI: 10.1007/s12033-012-9511-1
30. Truong L, Hevener KE, Rice AJ, Patel K, Johnson ME, Lee H. High-level expression, purification, and characterization of *Staphylococcus aureus* dihydroorotase (PyrC) as a cleavable His-SUMO fusion. *Protein Expr Purif*. 2013 Mar;88(1):98-106. DOI: 10.1016/j.pep.2012.11.018
31. Wang Z, Li N, Wang Y, Wu Y, Mu T, Zheng Y, et al. Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification. *Protein Expr Purif*. 2012 Mar;82(1):174-8. DOI: 10.1016/j.pep.2011.11.017
32. Asher WB, Bren KL. A heme fusion tag for protein affinity purification and quantification. *Protein Sci*. 2010 Oct;19(10):1830-9. DOI: 10.1002/pro.460
33. Kim Y, Ganesan P, Ihee H. High-throughput instant quantification of protein expression and purity based on photoactive yellow protein turn off/on label. *Protein Sci*. 2013 Aug;22(8):1109-17. DOI: 10.1002/pro.2286
34. Hsieh JM, Besserer GM, Madej MG, Bui HQ, Kwon S, Abramson J. Bridging the gap: a GFP-based strategy for overexpression and purification of membrane proteins with intra and extracellular C-termini. *Protein Sci*. 2010 Apr;19(4):868-80. DOI: 10.1002/pro.365
35. Guillén D, Moreno-Mendieta S, Aguilera P, Sánchez S, Farres A, Rodríguez-Sanoja R. The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 May;97(9):4141-8. DOI: 10.1007/s00253-013-4778-0
36. Islam T, Aguilar-Yañez JM, Simental-Martínez J, Ortiz-Alcaraz CI, Rito-Palomares M, Fernandez-Lahore M. A novel strategy for the purification of a recombinant protein using ceramic fluorapatite-binding peptides as affinity tags. *J Chromatogr A*. 2014 Apr 25;1339:26-33. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.079
37. Horiuchi M, Takahashi K, Kobashigawa Y, Ochiai M, Inagaki F. A low-cost affinity purification system using β -1,3-glucan recognition protein and curdlan beads. *Protein Eng Des Sel*. 2012 Aug;25(8):405-13. DOI: 10.1093/protein/gzs028
38. Li J, Zhang Y, Yang Y. Characterization of the diatomite binding domain in the ribosomal protein L2 from *E. coli* and functions as an affinity tag. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Mar;97(6):2541-9. DOI: 10.1007/s00253-012-4367-7
39. Sangawa T, Tabata S, Suzuki K, Saheki Y, Tanaka K, Takagi J. A multipurpose fusion tag derived from an unstructured and hyperacidic region of the amyloid precursor protein. *Protein Sci*. 2013 Jun;22(6):840-50. DOI: 10.1002/pro.2254
40. Li Y. The tandem affinity purification technology: an overview. *Biotechnol Lett*. 2011 Aug;33(8):1487-99. DOI: 10.1007/s10529-011-0592-x
41. Li Y. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010 Feb 15;55(2):73-83. DOI: 10.1042/BA20090273
42. Xu X, Song Y, Li Y, Chang J, Zhang H, An L. The tandem affinity purification method: an efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. *Protein Expr Purif*. 2010 Aug;72(2):149-56. DOI: 10.1016/j.pep.2010.04.009
43. Stamsás GA, Håvarstein LS, Straume D. ChiC, a new tandem affinity tag for the protein purification toolbox. *J Microbiol Methods*. 2013 Jan;92(1):59-63. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.11.003
44. Cao H, Chapital DC, Howard OD Jr, Deterding LJ, Mason CB, Shockey JM, Klasson KT. Expression and purification of recombinant tung tree diacylglycerol acyltransferase 2. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Nov;96(3):711-27. DOI: 10.1007/s00253-012-3869-7
45. Li Y, Wang J, Yang J, Wan C, Wang X, Sun H. Recombinant expression, purification and characterization of antimicrobial peptide ORBK in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2014 Mar;95:182-7. DOI: 10.1016/j.pep.2013.12.011
46. Farkas D, Franzén LG, Hansson Ö. Cloning, expression and purification of the luminal domain of spinach photosystem 1 subunit PsfA functional in binding to plastocyanin and with a disulfide bridge required for folding. *Protein Expr Purif*. 2011 Aug;78(2):156-66. DOI: 10.1016/j.pep.2011.02.007
47. Nespovitaya N, Barylyuk K, Eichmann C, Zenobi R, Riek R. The production of recombinant (15)N, (13)C-labelled somatostatin 14 for NMR spectroscopy. *Protein Expr Purif*. 2014 Jul;99:78-86. DOI: 10.1016/j.pep.2014.03.011
48. Wu M, Zhao L, Zhu L, Chen Z, Li H. Expression and purification of chimeric peptide comprising EGFR B-cell epitope and measles virus fusion protein T-cell epitope in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2013 Mar;88(1):7-12. DOI: 10.1016/j.pep.2012.11.010
49. Miladi B, Dridi C, El Marjou A, Boeuf G, Bouallagui H, Dufour F, Di Martino P, Elm'selmi A. An improved strategy for easy process monitoring and advanced purification of recombinant proteins. *Mol Biotechnol*. 2013 Nov;55(3):227-35. DOI: 10.1007/s12033-013-9673-5
50. Frey S, Görlich D. Purification of protein complexes of defined subunit stoichiometry using a set of orthogonal, tag-cleaving proteases. *J Chromatogr A*. 2014 Apr 11;1337:106-15. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.030
51. Huang Q, Li Q, Chen AS, Kang C. West Nile virus protease activity in detergent solutions and application for affinity tag removal. *Anal Biochem*. 2013 Apr 1;435(1):44-6. DOI: 10.1016/j.ab.2012.12.015
52. Ye W, Wang H, Ma Y, Luo X, Zhang W, Wang J, Wang X. Characterization of the glutamate-specific endopeptidase from *Bacillus licheniformis* expressed in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2013 Oct 10;168(1):40-5. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.009
53. Li Y. Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnol Lett*. 2011 May;33(5):869-81. DOI: 10.1007/s10529-011-0533-8
54. Wood DW. Non-chromatographic recombinant protein purification by self-cleaving purification tags. *Separation Science and Technology*. 2010;45(15):2245-57.
55. Southworth MW, Amaya K, Evans TC, Xu MQ, Perler FB. Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the *Mycobacterium xenopi* gyrase A intein. *Biotechniques*. 1999 Jul;27(1):110-4, 116, 118-20. DOI: 10.2144/99271st04
56. Wood DW, Wu W, Belfort G, Derbyshire V, Belfort M. A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. *Nat Biotechnol*. 1999 Sep;17(9):889-92. DOI: 10.1038/12879
57. Chong S, Mersha FB, Comb DG, Scott ME, Landry D, Vence LM, et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*. 1997 Jun 19;192(2):271-81. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00105-4

58. Shi C, Meng Q, Wood DW. A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Jan;97(2):829-35. DOI: 10.1007/s00253-012-4601-3
59. Liu F, Tsai SL, Madan B, Chen W. Engineering a high-affinity scaffold for non-chromatographic protein purification via intein-mediated cleavage. *Biotechnol Bioeng*. 2012 Nov;109(11):2829-35. DOI: 10.1002/bit.24545
60. Tian L, Sun SS. A cost-effective ELP-intein coupling system for recombinant protein purification from plant production platform. *PLoS One*. 2011;6(8):e24183. DOI: 10.1371/journal.pone.0024183
61. Banki MR, Feng L, Wood DW. Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nat Methods*. 2005 Sep;2(9):659-61. DOI: 10.1038/nmeth787
62. Guan D, Ramirez M, Chen Z. Split intein mediated ultra-rapid purification of tagless protein (SIRP). *Biotechnol Bioeng*. 2013 Sep;110(9):2471-81. DOI: 10.1002/bit.24913
63. Nishimura Y, Takeda K, Ishii J, Ogino C, Kondo A. An affinity chromatography method used to purify His-tag-displaying bio-nanocapsules. *J Virol Methods*. 2013 May;189(2):393-6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.03.008
64. Maity R, Pauty J, Krietsch J, Buisson R, Genois MM, Masson JY. GST-His purification: a two-step affinity purification protocol yielding full-length purified proteins. *J Vis Exp*. 2013 Oct 29;(80):e50320. DOI: 10.3791/50320
65. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci*. 2013 Sep 24;73:9.9.1-9.9.23. DOI: 10.1002/0471140864.ps0909s73
66. Randolph TW. The two faces of His-tag: immune response versus ease of protein purification. *Biotechnol J*. 2012 Jan;7(1):18-9. DOI: 10.1002/biot.201100459
67. Schmidt PM, Sparrow LG, Attwood RM, Xiao X, Adams TE, McKimm-Breschkin JL. Taking down the FLAG! How insect cell expression challenges an established tag-system. *PLoS One*. 2012;7(6):e37779. DOI: 10.1371/journal.pone.0037779
68. Perotti N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M. A versatile ionic strength sensitive tag from a human GM-CSF-derived linear epitope. *Protein Expr Purif*. 2013 Sep;91(1):10-9. DOI: 10.1016/j.pep.2013.06.009
69. Schmidt TG, Batz L, Bonet L, Carl U, Holzapfel G, Kiem K, et al. Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expr Purif*. 2013 Nov;92(1):54-61. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.021
70. Salema V, Fernández LÁ. High yield purification of nanobodies from the periplasm of *E. coli* as fusions with the maltose binding protein. *Protein Expr Purif*. 2013 Sep;91(1):42-8. DOI: 10.1016/j.pep.2013.07.001
71. Hassouneh W, MacEwan SR, Chilkoiti A. Fusions of elastin-like polypeptides to pharmaceutical proteins. *Methods Enzymol*. 2012;502:215-37. DOI: 10.1016/B978-0-12-416039-2.00024-0
72. Meyer DE, Chilkoiti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. *Nat Biotechnol*. 1999 Nov;17(11):1112-5. DOI: 10.1038/15100
73. Shur O, Dooley K, Blenner M, Baltimore M, Banta S. A designed, phase changing RTX-based peptide for efficient bioseparations. *Biotechniques*. 2013 Apr;54(4):197-8, 200, 202, 204, 206. DOI: 10.2144/000114010
74. Xing L, Xu W, Zhou B, Chen Y, Lin Z. Facile expression and purification of the antimicrobial peptide histatin 1 with a cleavable self-aggregating tag (cSAT) in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2013 Apr;88(2):248-53. DOI: 10.1016/j.pep.2013.01.012
75. Xing L, Wu W, Zhou B, Lin Z. Streamlined protein expression and purification using cleavable self-aggregating tags. *Microb Cell Fact*. 2011 Jun 2;10:42. DOI: 10.1186/1475-2859-10-42
76. Costa SJ, Almeida A, Castro A, Domingues L, Besir H. The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Aug;97(15):6779-91. DOI: 10.1007/s00253-012-4559-1
77. Hayashi M, Iwamoto S, Sato S, Sudo S, Takagi M, Sakai H, Hayakawa T. Efficient production of recombinant cystatin C using a peptide-tag, 4AaCter, that facilitates formation of insoluble protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2013 Apr;88(2):230-4. DOI: 10.1016/j.pep.2013.01.011
78. Hwang PM, Pan JS, Sykes BD. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 2014 Jan 21;588(2):247-52. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.09.028
79. Hwang PM, Pan JS, Sykes BD. A PagP fusion protein system for the expression of intrinsically disordered proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2012 Sep;85(1):148-51. DOI: 10.1016/j.pep.2012.07.007
80. Kaldis A, Ahmad A, Reid A, McGarvey B, Brandle J, Ma S, Jevnikar A, Kohalmi SE, Menassa R. High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. *Plant Biotechnol J*. 2013 Jun;11(5):535-45. DOI: 10.1111/pbi.12041
81. Li Y. A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein. *Protein Expr Purif*. 2012 Feb;81(2):201-10. DOI: 10.1016/j.pep.2011.10.011
82. Haeckel A, Appler F, Figge L, Kratz H, Lukas M, Michel R, Schnorr J, Zille M, Hamm B, Schellenberger E. XTEN-annexin A5: XTEN allows complete expression of long-circulating protein-based imaging probes as recombinant alternative to PEGylation. *J Nucl Med*. 2014 Mar;55(3):508-14. DOI: 10.2967/jnumed.113.128108

Информация об авторах:

Платонов Михаил Евгеньевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетической инженерии и диагностики возбудителей особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Трунякова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Mikhail E. Platonov PhD (Biological Sciences), Leading Researcher Laboratory of Genetic Engineering and Diagnosis of Causative Agents of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Alexandra S. Trunyakova, Junior Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, Major Researcher of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Соблюдение требований биологической безопасности в диагностических лабораториях во время пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19)

Е.А.Тюрин, [Л.В.Чекан](#), М.В.Храмов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Проведение лабораторной диагностики биоматериалов бактериального и вирусного происхождения требует неукоснительного соблюдения требований биологической безопасности. Это касается и исследований, проводимых в лабораториях различных уровней защиты, использующих экспресс-методы полимеразной цепной реакции. Рассмотрены условия работ с биоматериалами, подозрительными на содержание возбудителей инфекционных заболеваний I–IV групп патогенности. Сделан вывод о необходимости строгого соблюдения требований биологической безопасности при проведении генетических исследований.

Ключевые слова: биологическая безопасность, возбудители инфекционных заболеваний, лабораторная диагностика, генетический материал, полимеразная цепная реакция

Для цитирования: Тюрин Е.А., [Чекан Л.В.](#), Храмов М.В. Соблюдение требований биологической безопасности в диагностических лабораториях во время пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19). Бактериология. 2022; 7(1): 55–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-55-61

Biosafety compliance in diagnostic laboratories during the SARS-CoV-2 virus (COVID-19) pandemic

Е.А.Tyurin, [L.V.Chekan](#), M.V.Khramov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Laboratory diagnostics of biomaterials of bacterial and viral origin requires strict adherence to biological safety requirements. This also applies to studies conducted in laboratories of various levels of protection using express methods of polymerase chain reaction. The work conditions with biomaterials suspicious for the presence of pathogens of infectious diseases of I–IV pathogenicity groups are considered. It is concluded that it is necessary to strictly comply with the requirements of biological safety when conducting genetic studies.

Key words: biological safety, pathogens of infectious diseases, laboratory diagnostics, genetic material, polymerase chain reaction

For citation: Tyurin E.A., [Chekan L.V.](#), Khramov M.V. Biosafety compliance in diagnostic laboratories during the SARS-CoV-2 virus (COVID-19) pandemic. Bacteriology. 2022; 7(1): 55–61. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-55-61

Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы является важной составляющей эпидемиологического надзора в рамках санитарной охраны территории Российской Федерации [1, 2]. Лабораторную диагностику биологического материала осуществляют различными методами, одним из которых является реакция амплификации нуклеиновых

кислот, или полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР – молекулярно-биологический метод, основанный на катализируемой ДНК-полимеразой реакции. Это очень быстрая реакция, в основе которой лежит многократное удвоение определенного участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*), позволяющая амплифицировать (*от англ.* amplify – многократно увеличивать, усили-

Для корреспонденции:

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0016
E-mail: turin@obolensk.org

Статья поступила 22.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Eugene A. Tyurin, MD, PhD, Leading Researcher of The Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0016
E-mail: turin@obolensk.org

The article was received 22.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

вать) в миллионы раз в течение нескольких часов в биологическом материале малые концентрации определенных фрагментов ДНК [3]. В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Кроме простого увеличения числа копий ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и может широко использоваться в биологической и медицинской практике – например, для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний, установления отцовства, клонирования генов, введения мутаций, выделения новых генов. Именно этим методом проводят диагностику вирусных инфекций, таких как гепатиты, ВИЧ, грипп, коронавирус и др.

Специфичность метода существенно выше, чем у иммунохимических и микробиологических методов, а принцип метода позволяет диагностировать наличие инфекций со значительной антигенной изменчивостью. Поэтому методы амплификации нуклеиновых кислот микроорганизмов I–IV групп патогенности используют в биологии и медицине в качестве:

- метода экспресс-диагностики при исследовании биологического материала, взятого от человека, с целью выявления ДНК/РНК микроорганизмов I–IV групп патогенности и их количественной оценки;
- метода специфической индикации патогенных биологических агентов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах;
- ускоренного предварительного теста при выполнении культурального и биологического методов исследования и для идентификации культур;
- оценки эпидемиологической значимости изолятов на основании выявления генетических маркеров вирулентности и патогенности, антибиотикоустойчивости;
- оценки таксономической характеристики штаммов на основании выявления специфических видовых, родовых и других маркеров;
- оценки генотипирования штаммов с целью определения их происхождения;
- основы прогнозирования течения инфекционного заболевания и оценки эффективности проводимой терапии.

Исследование материала, содержащего или подозрительного на содержание микроорганизмов I–IV групп патогенности, методами амплификации нуклеиновых кислот связано с необходимостью одновременного обеспечения и соблюдения персоналом правил биологической безопасности (ББ) и требований к организации при проведении данных работ с целью предотвращения контаминации помещений и оборудования нуклеиновыми кислотами и/или ампликонами исследуемых проб.

Данные исследования проводят в лабораториях организаций, имеющих лицензию на деятельность, связанную с возбудителями инфекционных заболеваний человека бактериальной и/или вирусной природы. Лаборатории, в которых проводят диагностические исследования, должны иметь «срочные» санитарно-эпидемиологические заключения, вы-

данные в установленном порядке на срок не более пяти лет, о соответствии условий государственным санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативным документам [4–6].

Целью работы являлась оценка условий ББ в диагностических лабораториях различных учреждений и организаций, выполняющих исследования при помощи ПЦР.

Соблюдение противозидемического режима работы лаборатории должно быть обеспечено в соответствии с положениями санитарно-эпидемиологических правил и требованиями ББ, регламентирующими работу с микроорганизмами I–II и III–IV групп патогенности соответственно [6–8]. Проведение исследований биологического материала без предварительного накопления возбудителя возможно в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III–IV групп патогенности, но с указанием конкретных видов микроорганизмов, которое также выдается в установленном порядке [4], то есть допускается исследование биологического материала, подозрительного на инфицирование микроорганизмами II группы патогенности, в лаборатории, имеющей санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями III–IV групп патогенности, только в тех случаях, для которых разработаны и утверждены нормативные документы, регламентирующие порядок проведения таких исследований в условиях данной лаборатории.

Размещение и организация деятельности лаборатории для проведения ПЦР

При строительстве новых лабораторий или при реконструкции старых помещений лабораторию стараются размещать в отдельно стоящем здании или изолированной части здания, этажа с соблюдением требований санитарно-эпидемиологических правил, соблюдая условия наличия «чистой» и «заразной» зон [6–8]. Помещения лаборатории должны быть обустроены в виде боксов с предбоксами с указанием рабочих зон. Боксовые помещения оборудуются приточно-вытяжной вентиляцией с высокоэффективными фильтрами очистки воздуха класса безопасности не ниже H14; водопроводом, не связанным с централизованной сетью (через бак разрыва струи); канализацией с системой обеззараживания сточных вод; электричеством и отоплением; средствами пожаротушения; естественным и искусственным освещением. Внутренние помещения «чистой» и «заразной» зон лаборатории должны быть непроницаемы для грызунов и насекомых. Стены, пол и потолок помещений отделывают кафелем или краской, устойчивой к действию моющих и дезинфицирующих растворов. Они должны быть гладкими, без щелей, легко обрабатываемыми. В рабочих помещениях «заразной» зоны устанавливают бактерицидные лампы [9]. Окна плотно закрыты, без форточек, возможно использование светозащитных пленок из материала, устойчивого к действию используемых дезинфицирующих средств.

Архитектурно-планировочные решения и размещение оборудования в лаборатории должны обеспечивать точность движения исследуемого материала. Лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна иметь определенный набор расположенных последовательно са-

мостоятельных рабочих помещений-зон или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений:

- рабочая зона 1 – зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки доставленного материала;
- рабочая зона 2 – зона выделения нуклеиновых кислот;
- рабочая зона 3 – зона приготовления реакционных смесей и проведения реакции амплификации (ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), *англ.* Real-time PCR) и учета ее результатов при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции;
- рабочая зона 4-1 – зона учета результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза и/или гибридационно-ферментным методом детекции;
- рабочая зона 4-2 – зона учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования и/или на ДНК-чипах.

Материал передают между зонами в контейнерах через шлюзы, в которых установлены бактерицидные лампы для обеззараживания воздуха.

Лаборатория оборудуется вспомогательными помещениями: комнатами для персонала, кабинетом заведующего лабораторией, раздевалками для сотрудников, комнатой приема пищи, туалетом, подсобными (складскими) помещениями, которые располагаются на «чистой» стороне лаборатории. Обеззараживание исследуемого материала проводится в помещении автоклава, которая может быть общей с другими подразделениями учреждения, но при условии соблюдения требований ББ – разделения материальных потоков по времени доставки и месту предварительного хранения.

Прием материала, его маркировку, регистрацию в специальном журнале, первичную подготовку (концентрирование материала путем центрифугирования, фильтрации, иммуносорбции, суспендирование, перевод сухих и плотных материалов в жидкую фазу и т.д.), объединение или разделение проб на аликвоты, обеззараживание и хранение проб, обеззараживание остатков исследуемого материала осуществляют в рабочей зоне 1. В рабочей зоне 2 проводят выделение и очистку нуклеиновых кислот микроорганизмов из проб, подготовленных в рабочей зоне 1.

В рабочей зоне 3 осуществляют приготовление реакционных смесей, проведение обратной транскрипции, амплификации нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции.

Приготовление реакционных смесей для проведения обратной транскрипции и амплификации нуклеиновых кислот осуществляют до доставки в рабочую зону 3 проб, подготовленных в рабочей зоне 2.

Можно разделить рабочую зону 3 на две подзоны (3а и 3б), разместив их в отдельных помещениях. В подзоне 3а готовят реакционные смеси и проводят обратную транскрипцию. В подзоне 3б проводят амплификацию нуклеиновых кислот и учет результатов амплификации при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции. При необходимости возможно совмещение рабочей зоны 2 и рабочей зоны 3 в одном помещении при наличии в нем отдельных боксов микробиологической безопасности II или III классов для каждой из рабочих зон.

Рабочие зоны 4-1 и 4-2 располагают изолированно от рабочих зон 1–3 для предотвращения их контаминации продуктами амплификации через воздух. Рабочая зона 4-1 предназначена для учета результатов продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза и/или гибридационно-ферментным методом детекции, а также очистки продуктов амплификации для секвенирования. Рабочая зона 4-2 предназначена для учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования и/или на ДНК-чипах.

При использовании различных методов учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот (электрофорез, гибридационно-ферментативный анализ, секвенирование и ДНК-чипы) в рабочих зонах 4-1 и 4-2 выделяют отдельные рабочие подзоны или отдельные боксированные помещения (отдельные изолированные помещения) для каждого типа детекции. Объединение рабочих зон 4-1 и 4-2 запрещается.

Как было сказано выше, помещения лаборатории оборудуют приточно-вытяжной вентиляцией [6–8]. Воздушный режим в рабочих зонах 1 и 2 регулируют таким образом, чтобы вытяжка преобладала над притоком и в помещениях присутствовало разрежение 100–150 Па. В рабочей зоне 3 объем приточного воздуха должен соответствовать объему на вытяжке, и, таким образом, разрежение отсутствует.

Рабочие зоны 4-1 и 4-2 желателно оборудовать автономной системой приточно-вытяжной вентиляции. Вытяжка должна преобладать над притоком и создавать разрежение в помещении зон 100–150 Па. В условиях жаркого климата разрешается установка кондиционеров в помещениях рабочих зон лаборатории при условии их выключения на время проведения работ с последующей дезинфекционной обработкой рабочего места.

Каждая самостоятельная рабочая зона оснащается минимальным набором соответствующего лабораторного оборудования в зависимости от их функционального назначения и риска контаминации, мебелью, многоразовой и одноразовой пластиковой и стеклянной посудой, расходными материалами, защитной одеждой и уборочным инвентарем, который используется только в данном помещении. Лабораторная мебель, оборудование и принадлежности каждой рабочей зоны маркируют номером указанной зоны или помещения. Их применение в других рабочих зонах (помещениях) или для других видов исследований не допускается.

Рабочие поверхности лабораторной мебели и используемого оборудования должны быть устойчивы к действию моющих и дезинфицирующих растворов, ультрафиолетового излучения. Поверхность столов не должна иметь трещин и швов. Оборудование и измерительные приборы, используемые в работе, должны быть исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации и по соблюдению требований ББ, соответствовать нормам электробезопасности и электромагнитной совместимости. Средства измерения не реже одного раза в год поверяют в специализированных центрах. В лаборатории в каждом предбоксе должна быть аварийная аптечка стандартной комплектации для оказания первой медицинской помощи при авариях в соответствии с действующими санитарными правилами в зависимости от того с каким возбудителем бактериальной

или вирусной природы будут проводить работы «заразной» зоне [6–8]. Каждый предбокс оборудуется световой и звуковой аварийной сигнализацией, которая выводится в коридор и на пост дежурного по лаборатории.

Допуск сотрудников лаборатории к работам по исследованию материала, поступившего на диагностику

Допуск сотрудников для проведения диагностических работ материала, имеющего в своей основе генетические конструкции, осуществляют на тех же условиях, что и допуск персонала к работам с микроорганизмами бактериальной или вирусной природы [6, 7]: после прохождения входного медицинского осмотра, первичной подготовки на специализированных курсах с основами ББ и на сертификационных специальных курсах по постановке реакции амплификации (ПЦР), инструктажа по ББ и сдачи зачета по знанию требований и положений ББ. Все работы с материалом выполняют, соблюдая принцип парности (работа только вдвоем). При этом нахождение в «заразной» зоне не должно превышать 4 ч. При длительной работе (>4 ч) возможен перерыв в течение 60 мин с выходом из зоны и отдыхом с последующим возвратом в «заразную» зону [7, 8].

Требования биологической безопасности к порядку получения проб, подготовке их для исследования и постановке реакции

В соответствии с письмом руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) Поповой А.Ю. «...возникающие (впервые выделенные) патогенные биологические агенты, не включенные в Классификацию, а также известные ранее, однако обладающие новыми патогенными для человека свойствами патогенные биологические агенты, в отношении которых известны случаи летальных исходов заболевания и/или имеются сведения о высоком эпидемическом потенциале, следует относить ко II группе патогенности» [10].

Любые клинико-диагностические и лабораторные работы, связанные с использованием потенциально инфицированного или инфицированного новым коронавирусом (COVID-19) материала, могут проводиться исключительно в лабораториях, имеющих лицензию на осуществление деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных II степени потенциальной опасности [5]. Следовательно, проведение всех работ по подготовке и постановке реакции амплификации должно соответствовать требованиям санитарных правил для микроорганизмов II группы патогенности [7, 8].

Исследование материала, содержащего (подозрительно на содержание) микроорганизмы, осуществляют специалисты с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшие подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) (только при работе с данными микроорганизмами) или с микроорганизмами III–IV групп патогенности, получившие дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

Для исследований в случае воздушно-капельных инфекций, как в случае с возбудителем новой коронавирусной инфекции COVID-19, в лабораторию доставляют мазки. Мазки (слизь) носоглотки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой палочке. Использовать деревянные палочки не рекомендуется. Тампон вводят легким движением по внутренней стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль внутренней стенки носа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с защелкивающейся крышкой, содержащую соответствующую транспортную среду, и аккуратно обрезают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой. При этом допускается только однократное замораживание–оттаивание исследуемого материала.

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой палочке вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. Использовать деревянные палочки также не рекомендуется. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой и аккуратно обрезают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Для получения достоверных результатов следует строго соблюдать условия хранения и перевозки отобранного материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от +2 до +8°C – в течение 3 суток;
- при температуре -20°C – в течение 1 мес.;
- при температуре -70°C – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание–оттаивание материала.

Весь поступающий материал направляют в рабочую зону 1 для приема, регистрации, разбора, первичной обработки и обеззараживания материала. В рабочую зону 2 материал подлежит передаче только после обеззараживания в маркированных одноразовых микроцентрифужных пробирках объемом 1,5–2,0 мл с закрытой крышкой. После окончания работы в рабочей зоне 2 пробирки передают в рабочую зону 3, где предварительно проведена работа по подготовке реакционных смесей для проведения реакции амплификации. После окончания работы в рабочей зоне 3, если для учета результатов используется метод электрофореза и/или гибридационно-ферментативный метод детекции, пробирки переносят в рабочую зону 4-1 для проведения анализа. В случае применения для регистрации результатов реакции амплификации секвенирования работы по очистке ампликонов осуществляют в рабочей зоне 4-1 с последующим переносом пробирок в рабочую зону 4-2 для завершения анализа. Если учет реакции амплификации осуществляют с использованием ДНК-чипов, пробирки из рабочей зоны 3 для проведения анализа переносят в рабочую зону 4-2. Эти положения прописаны

ны в нормативно методических документах о правилах отбора и доставки биоматериала для проведения реакции амплификации [3].

Дальнейшие исследования проводят с разобранным, кодированным биоматериалом, пробирки с которым установлены в специальные штативы по 24 штуки в каждом. Передача разобранного материала осуществляется в контейнерах.

При проведении исследований с использованием методов амплификации нуклеиновых кислот следует соблюдать следующие правила работы [3, 6–8]:

- обеспечивать поточность движения исследуемого материала, проб нуклеиновых кислот, продуктов амплификации;
- разбор материала, его предварительную обработку, хранение, перевозку и передачу на исследование в рабочую зону 1 осуществлять согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований для каждого вида возбудителя инфекций, инструкциям к наборам реагентов;

- передачу исследуемого материала в рабочую зону 1 и проб при смежном расположении помещений рабочих зон 1, 2, 3 (3а и 3б) желательно осуществлять через шлюзовые передаточные окна, а в рабочие зоны 4-1 и 4-2 – через передаточные окна;

- перенос проб из одной рабочей зоны в другую, а также их хранение в этих помещениях осуществляют в плотно закрывающихся металлических или пластиковых контейнерах с возможностью опечатывания, в штативах с их последующей обработкой регламентируемыми дезинфицирующими средствами после каждого использования;

- при исследовании материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами I–IV групп патогенности, все манипуляции в рабочих зонах 1 и 2, включая манипуляции, сопровождающиеся риском образования аэрозоля (встряхивание, центрифугирование и т.д.) при обработке материала и выделении нуклеиновых кислот, выполняют в боксах микробиологической безопасности II или III класса;

- по окончании работы все объекты, инфицированные (подозрительные на инфицирование) микроорганизмами I–IV групп патогенности, помещают на хранение в холодильное (морозильное) оборудование (бытовые и промышленные холодильники (морозильники) и шкафы, холодильные камеры) на время проведения исследований. Рабочее место и рабочие поверхности оборудования подвергают дезинфекции;

- работы в рабочих зонах 3, 4-1 и 4-2 выполняют в боксах микробиологической безопасности II класса или ПЦР-боксе. При работе с материалом, содержащим микроорганизмы III–IV групп патогенности, этапы анализа, выполняемые в рабочих зонах 4-1 и 4-2, проводят на лабораторных столах;

- каждая манипуляция после ее завершения обязательно должна сопровождаться сменой наконечников для автоматических пипеток;

- расходные материалы (наконечники, пробирки и т.д.), наборы реагентов должны строго соответствовать используемому оборудованию (автоматическим пипеткам, термоциклерам и т.д.);

- рекомендуется использование источников бесперебойного питания при подключении амплификационного оборудования;

- условия хранения наборов реагентов (комплектов реагентов), образцов проб должны соответствовать инструкциям по применению. Образцы проб, содержащих нуклеиновые кислоты и/или ампликоны, хранят отдельно от реагентов в разных холодильниках. Не допускается использование не сертифицированных наборов, реагентов с истекшим сроком годности, хранившихся в условиях нарушения температурного режима;

- холодильное оборудование должно быть оснащено средствами ручного или автоматического температурного контроля и регистрации, свидетельствующими о реальном режиме хранения наборов реагентов и исследуемых проб.

Использование рабочей и защитной одежды при проведении различных этапов постановки реакции

При работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности выбор типа защитного костюма, рабочей одежды и средств индивидуальной защиты органов дыхания проводят в строгом соответствии с нормативными документами [6–8] в зависимости от вида возбудителя, рабочей зоны, оснащения ее боксами микробиологической безопасности. Эти же требования и положения распространяются и на проведение генетических работ и исследований, в частности на проведение реакции амплификации.

Каждая рабочая зона (помещение) обеспечивается необходимым количеством комплектов рабочей и защитной одежды: комбинезон или пижама, противочумный халат, шлем или шапочка, одноразовые резиновые перчатки (две пары), сменная обувь, очки и респиратор/полумаска 3-го класса безопасности (FFP3). При работе в помещении детекции продуктов амплификации поверх обуви надевают одноразовые бахилы или меняют тапочки на боксовую обувь. Рекомендуется использование одноразовой одежды. Использование одежды из другой зоны запрещено.

В предбоксах устанавливают промаркированные емкости с дезинфицирующим раствором, куда укладывают каждый элемент защитной одежды, каждый строго в свою емкость. Наиболее загрязненной продуктами амплификации считается защитная одежда рабочих зон 4-1 и 4-2, особенно верхние защитные перчатки, которые снимают в первую очередь.

Надевание и, особенно, снятие защитной одежды производят в предбоксах рабочих помещений после окончания всех работ, а также при проведении перерыва в работе или при переходе из одного помещения в другое, чтобы не контаминировать пути движения людей продуктами проведенных исследований. В каждом предбоксе должен быть отдельный комплект защитной одежды и обуви [6–8]. После снятия каждого элемента противочумного костюма руки в перчатках погружают в дезинфицирующий раствор, а после снятия перчаток руки протирают тампоном со спиртом, а затем моют с мылом.

Требования биологической безопасности к деконтаминации помещений и обеззараживанию материала

Деконтаминацию, или обеззараживание, помещений проводят регулярно, используя дезинфицирующие средства в

соответствии с требованиями нормативных методических документов [3, 6–8]. Ежедневно в начале рабочего дня проводят влажную уборку, по завершению работ с материалом – текущую дезинфекцию. Рабочие зоны, расположенные в помещениях лаборатории, ежедневно обеззараживают ультрафиолетовым облучением с записью в специальном журнале с указанием времени проведения облучения (не менее 30 мин).

Каждая рабочая зона, расположенная в помещениях лаборатории, обеспечивается промаркированным набором уборочного инвентаря. Использование промаркированного индивидуального для каждой зоны уборочного инвентаря для уборки других помещений лаборатории не допускается.

Рабочую поверхность столов и столешниц боксов микробиологической безопасности и поверхности оборудования перед началом работы протирают 70%-м этиловым спиртом.

При использовании кондиционеров ежемесячно проводят очистку и обработку радиаторной решетки кондиционера и накопителя конденсата 0,2%-м раствором ДП-2Т с заменой фильтров. Во время проведения работ с материалом включать кондиционер не разрешается [3, 6–8]. Не менее чем один раз в год осуществляют дезинфекционную обработку автоматических дозаторов. Дозаторы разбирают, обрабатывают (замачивают) в моющем растворе для удаления жирового загрязнения, после чего остатки моющего средства удаляются ветошью, смоченной водой. Затем проводят обработку раствором 1 N соляной кислоты с экспозицией не менее 1 ч. Остатки раствора тщательно удаляют ветошью, смоченной водой, и проводят обеззараживание влажных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч. По окончании обработки дозаторы собирают и проводят калибровку в соответствии с прилагаемой инструкцией по пользованию дозаторами. Автоклавируемые дозаторы обеззараживают паром под давлением 1,7 атм. при температуре $120 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин.

Остатки биоматериала, инфицированного или подозрительного на инфицирование микроорганизмами I–IV групп патогенности или их фрагментами (ДНК, РНК), использованную посуду после дезинфекции соответствующими дезинфицирующими препаратами собирают в закрывающиеся емкости (контейнеры) и передают на автоклавируемые. Слив необеззараженных жидкостей в канализационную сеть не допускается.

При возникновении аварийной ситуации или подозрении на контаминирование помещений лаборатории работы по проведению реакции амплификации немедленно останавливают и проводят мероприятия по ликвидации контаминации.

При случайном открытии пробирок с продуктами амплификации (рабочая зона 3) необходимо, остановив работу, надеть перчатки (при их отсутствии), закрыть пробирки, заменить перчатки и провести мероприятия по ликвидации возможной контаминации. Следовательно, необходимо соблюдать санитарно-гигиенические требования и проводить постоянный внешний и внутренний контроль обсемененности рабочих помещений, в которых проводят работы с биоматериалом. Необходимо регулярно отбирать мазки у работающих сотрудников, их окружения, а также делать смывы с рабочих поверхностей и оборудования с последующей постановкой реакции амплификации.

Организацию комплекса мероприятий по ББ в лаборатории обеспечивает ее руководитель, а в организации – директор. Срочность выполнения работ, недостатки в материальном техническом обеспечении и другие причины не могут служить основанием для снижения или отступления от требований положений ББ. Каждый сотрудник лаборатории и/или прикомандированные специалисты обязаны сообщать руководству лаборатории и организации о выявленных нарушениях ББ [7, 8].

Таким образом, проведение диагностических работ с генетическим материалом от бактерий или вирусов с использованием реакции амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР-реакции) требует определенных знаний не только в области проведения генетических исследований, но и в области ББ, а также неукоснительного исполнения требований и предписаний специалистов в этой области, понимания ответственности за правильность выполнения операций и действий.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. акад. РАМН Онищенко ГГ, академика РАМН Кутырева ВВ. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико»; 2013, 560 с.
2. Санитарно-эпидемиологические правила. «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19).» СП 3.1.3597-20. 2020.
3. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» МУ 1.3.2569-09. 2009.
4. Санитарно-эпидемиологические правила «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами». СП 1.3.1318-03. 2003.
5. Постановление правительства РФ «О лицензировании деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных (за исключением случая, если указанная деятельность осуществляется в медицинских целях) и генно-инженерно-модифицированных организмов III и IV степеней потенциальной опасности, осуществляемой в замкнутых системах» от 16 апреля 2012 г. №317.
6. СанПиН «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 3.3686-21, 2021,1092 с.
7. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08. 2008. 92 с. с дополнениями 1 (СП 1.3.2518-09) и 2 (СП 1.3.2885-11).

8. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13. 2014. 195 с.
9. Руководство «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях». Р 3.5.1904-04. 2004. 25 с.
10. Информационное письмо Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) Поповой А.Ю. от 06.03.2020 №02/3739-2020-32.

References

1. Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Edited by Onishchenko GG, Kuttyrev VV. 2nd ed. Moscow: "Shiko" Publ.; 2013, 560 p. (In Russian).
2. Sanitary and epidemiological rules. "Prevention of new coronavirus infection (COVID-19)." SP 3.1.3597-20. 2020. (In Russian).
3. Guidelines "Organization of work of laboratories using methods of amplification of nucleic acids when working with material containing microorganisms of pathogenicity groups I–IV" MU 1.3.2569-09. 2009. (In Russian).
4. Sanitary and epidemiological rules "The procedure for issuing a sanitary and epidemiological conclusion on the possibility of carrying out work with pathogens of human infectious diseases of groups I–IV of pathogenicity (danger), genetically engineered microorganisms, poisons of biological origin and helminths". SP 1.3.1318-03. 2003. (In Russian).
5. Decree of the Government of the Russian Federation "On licensing activities in the field of the use of pathogens of infectious diseases of humans and animals (except if the specified activity is carried out for medical purposes) and genetically

- engineered organisms of III and IV degrees of potential danger carried out in closed systems" dated April 16, 2012 No 317. (In Russian).
6. SanPiN "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases", 3.3686-21, 2021,1092 p. (In Russian).
7. Sanitary and epidemiological rules "Safety of work with microorganisms of the III–IV groups of pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases". SP 1.3.2322-08. 2008. 92 p. with additions 1 (SP 1.3.2518-09) and 2 (SP 1.3.2885-11). (In Russian).
8. Sanitary and epidemiological rules "Safety of work with microorganisms of groups I–II of pathogenicity (danger)". SP 1.3.3118-13. 2014. 195 p. (In Russian).
9. Manual "Use of ultraviolet bactericidal radiation for disinfection of indoor air". P3.5.1904-04. 2004. 25 p. (In Russian).
10. Information letter from the Head of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) Popova A.Yu. 06.03.2020 No 02/3739-2020-32. (In Russian).

Информация об авторах:

Чекан Лариса Владимировна, старший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Храмов Михаил Владимирович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Larisa V. Chekan, Senior Researcher Head of the Laboratory of Biological Safety, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Mikhail V. Khranov, MD, PhD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Систематическое длительное изучение кишечной палочки в Англии демонстрирует стабильную популяционную структуру

Escherichia coli, вызывающая инфекции мочевыводящих путей и бактериемию, интенсивно исследуется, в том числе в работах, посвященных вирулентной, глобально распространенной, мультирезистентной линии ST131. Чтобы контекстуализировать ST131 в более широкой популяции *E. coli*, связанной с заболеванием, была применена геномика для анализа систематического 11-летнего стационарного обследования *E. coli*, связанного с бактериемией, с использованием изолятов, собранных со всей Англии. Анализ динамики популяции наиболее успешных клонов выявил появление ST131 и ST69 и их становление в качестве двух из пяти наиболее распространенных клонов наряду с ST73, ST95 и ST12. Наиболее часто идентифицируемой линией была ST73. По сравнению с ST131 ST73 был чувствителен к большинству антибиотиков, что указывает на то, что множественная лекарственная устойчивость не была доминирующей причиной преобладания клонов *E. coli* в этой популяции. Временной филогенетический анализ появления ST69 и ST131 выявил различия в динамике появления и показал, что распространение ST131 в этой популяции не было обусловлено последовательным появлением все более резистентных субклонов. Мы показали, что с течением времени популяция *E. coli* только временно нарушалась введением новых клонов, прежде чем было быстро достигнуто новое равновесие. В совокупности эти результаты предполагают, что частота клонов *E. coli* при инвазивном заболевании определяется отрицательным частотно-зависимым отбором, происходящим за пределами больницы, наиболее вероятно – в комменсальной нише, и что лекарственная устойчивость не является основным фактором успеха в этом ниша.



Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, et al.

Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131.

Genome Res. 2017 Jul 18;27(8):1437–49. DOI: 10.1101/gr.216606.116

Значимые клинико-лабораторные факторы риска в развитии инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения

Д.В.Старикова, Н.В.Богачева

ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет», Киров, Российская Федерация

В статье рассмотрена проблема риска развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения. Статистическим обоснованием данной проблемы является рост родоразрешения при помощи кесарева сечения и, соответственно, увеличение возможного риска развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения. В обзоре рассмотрены основные клинические факторы риска развития инфекционных послеоперационных осложнений, которые, с позиции анамнеза, разделены на группы: факторы риска общего, гинекологического и акушерского анамнеза женщины. Проанализированы лабораторные показатели как маркеры риска развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения. Рассмотрена значимость комплексного подхода к данной проблеме. Показаны возможности современной микробиологической диагностики для быстрого решения вопроса о назначении эффективной антибиотикотерапии.

Ключевые слова: кесарево сечение, инфекция хирургической акушерской раны, несостоятельность швов на передней брюшной стенке, микробная контаминация, клинико-лабораторная диагностика

Для цитирования: Старикова Д.В., Богачева Н.В. Значимые клинико-лабораторные факторы риска в развитии инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения. Бактериология. 2022; 7(1): 62–67. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-62-67

Significant clinical and laboratory risk factors in the development of purulent-septic complications after cesarean section

D.V.Starikova, N.V.Bogacheva

Kirov State Medical University, Kirov, Russian Federation

The article deals with the problem of the risk of developing infection of a surgical obstetric wound after cesarean section. The statistical justification for this problem is the increase in delivery with the help of a cesarean section, as a result of which there is a possible risk of developing an infection of a surgical obstetric wound after a cesarean section. The review considers the main clinical risk factors for the development of postoperative infectious complications, which, from the point of view of anamnesis, are divided into groups: risk factors for a woman's general, gynecological and obstetric anamnesis. Analyzed laboratory parameters as markers of the risk of developing infection of a surgical obstetric wound after cesarean section. Considered the importance of an integrated approach to this problem. The possibilities of modern microbiological diagnostics for a quick solution to the issue of prescribing effective antibiotic therapy are shown.

Key words: cesarean section, infection of a surgical obstetric wound, failure of sutures on the anterior abdominal wall, microbial contamination, clinical and laboratory diagnostics

For citation: Starikova D.V., Bogacheva N.V. Significant clinical and laboratory risk factors in the development of purulent-septic complications after cesarean section. Bacteriology. 2022; 7(1): 62–67. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-62-67

Частота абдоминального родоразрешения в России варьирует от 3 до 47,4%. Такой статистический разброс объясним различными возможностями медицинских стационаров [1, 2]. В настоящее время у каждой пятой оперированной пациентки послеоперационный период протекает с осложнениями [3, 4]. Несмотря на существующие про-

токолы лечения и совершенствование техники операций, использование современных шовных материалов и антибактериальных препаратов, кесарево сечение (КС) остается сложной операцией и создает дополнительный риск для возникновения послеоперационных осложнений. Увеличение частоты абдоминального родоразрешения сформировало

Для корреспонденции:

Старикова Дарья Валерьевна, аспирант кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет»

Адрес: 610027, Киров, ул. К. Маркса, 112
Телефон: (8332) 64-0976
E-mail: d_valerevna@list.ru

Статья поступила 13.01.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Daria V. Starikova, Postgraduate Student of the Department of Microbiology and Virology, Kirov State Medical University

Address: 112 Karl Marks str., Kirov, 610027, Russian Federation
Phone: (8332) 64-0976
E-mail: d_valerevna@list.ru

The article was received 13.01.2022, accepted for publication 30.03.2022

новую глобальную проблему для врачей практического здравоохранения в виде несостоятельности швов на передней брюшной стенке, которая по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) классифицируется как инфекция хирургической акушерской раны после КС [4, 5].

С целью предупреждения послеоперационных осложнений на передней брюшной стенке после КС врачи оценивают не только визуальные признаки воспаления (гиперемия, отек, деструкцию тканей в области шва, наличие микрогематом, серозное или гнойное отделяемое из шва на передней брюшной стенке), но и возможные предрасполагающие факторы [6, 7]. Значимость клиничко-лабораторных факторов риска развития инфекции хирургической акушерской раны после КС подчеркивают в своих работах многие ученые.

Так, Краснопольский В.И. с соавт. в качестве факторов риска развития послеоперационных осложнений после КС выделяют фоновые хронические заболевания, доля риска при которых в случае наличия хронических заболеваний органов дыхания составляет 67,2%, органов пищеварения – 74,2%, органов мочевого выделения – 57,3%, эндокринологических патологий – 17,0%. Среди факторов риска из гинекологического анамнеза следует отметить заболевания воспалительного характера, такие как бактериальный вагиноз и вагинит, хронический цервицит. Общая доля осложнений при данных нозологических формах составляет до 30%. С позиции акушерского анамнеза в группу риска развития послеоперационных осложнений вошли женщины с искусственными и самопроизвольными абортами – 45,0%, осложненным течением настоящей беременности – 40,0%, угрозой прерывания беременности – 6,0%, перенесенной во время настоящей беременности инфекционной экстрагенитальной и генитальной патологией – 66,5% [8].

Ткаченко Л.В. с соавт. при исследовании 100 пациенток после операции КС выделили следующие предрасполагающие факторы инфекции хирургической акушерской раны [9].

Из общих факторов риска инфекции хирургической акушерской раны после КС – хронические очаги инфекции в 26,0% случаев. Например, инфекции мочевыделительной системы являются фактором риска развития осложнения в 16,0–24,0% случаев; частота встречаемости гнойно-септических осложнений, трудно поддающихся лечению на фоне анемии, составляет 60,0–62,0%; у 22,0–24,0% женщин наблюдается нарушение жирового обмена, сопровождаемое снижением защитно-приспособительных реакций организма и удлинением продолжительности репаративных процессов [9].

Среди гинекологических заболеваний, имеющих в анамнезе у женщин с КС, авторами была выделена группа риска женщин с воспалительными заболеваниями половой сферы (10,0–14,0%) и инфекциями, передаваемыми половым путем (19,0–28,0%) [9].

В группу риска по инфекции хирургической акушерской раны после КС, с точки зрения акушерского анамнеза, авторами были выделены беременные, имеющие в анамнезе медицинские и самопроизвольные аборты (66,0%), затяжное течение родов (76,0%), с длительным (>6 ч) «безводным» промежутком (64,0%), с тяжелой преэклампсией (22,0%) [9].

В работе Мухлыниной И.А. и соавт. показано, что факторами риска развития инфекции хирургической акушерской

раны после КС являются: эрозия шейки матки, предшествующее в анамнезе бесплодие, острый и хронический сальпингофорит соответственно в 23,6; 21,8; 12,7 и 29,1% случаев [10].

Правильно оценить риск возможных осложнений после КС можно только по результатам анализа всей совокупности предрасполагающих факторов риска у данной категории женщин [11]. При этом необходимо учитывать их стартовый ресурс здоровья, риск развития скрытых патологий, которые могут проявить себя на фоне беременности. Также целесообразно определить возможные риски развития осложнений при последующих беременностях, с целью сохранения не только общего здоровья женщин, но и преумножения их репродуктивной функции, повышения рождаемости и снижения перинатальной смертности.

Дополнительно стоит оценить лабораторные критерии риска развития несостоятельности швов после КС [7, 11, 12].

Ведение женщин с послеоперационными гнойно-септическими осложнениями в стационарах, в том числе с инфекцией хирургической акушерской раны после КС, регламентировано клиническими рекомендациями «Септические осложнения в акушерстве», разработанными в соответствии со статьей 76 Федерального закона от 21 ноября 2011 г. №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» [13, 14].

Все методы лабораторной диагностики, которые в рамках данных рекомендаций могут быть использованы для оценки общего состояния женщины, выявления сопутствующих заболеваний, в том числе возможности присоединения инфекционного процесса в послеоперационном периоде, условно можно разделить на обязательные (общеклинические, гематологические, биохимические, иммунохимические), проводимые в условиях стационара всем женщинам с данными осложнениями, и дополнительные (иммунологические и микробиологические), которые выполняют по строгим показаниям с целью оценки тяжести и прогноза состояния, а возможность выполнения в желаемом объеме зависит от оснащенности лаборатории [13, 14].

Среди наиболее значимых лабораторных показателей следует выделить целесообразность определения в динамике на фоне беременности и в послеродовом периоде с целью диагностики анемии таких гематологических показателей, как уровень содержания в крови эритроцитов, гемоглобина, железа, витамина В₁₂ и фолиевой кислоты.

Из биохимических показателей в раннем послеоперационном периоде, когда отмечается гипо- и диспротеинемия, важна оценка общего белка и белковых фракций.

Большое значение для контроля интенсивности развития воспалительного процесса уделяется определению в динамике С-реактивного белка (СРБ). Его повышение в течение 8 ч после КС коррелирует с повышением температуры тела пациентки [7, 12–14].

Состояние гемостаза, с целью раннего выявления синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, оценивается по показателям коагулограммы, в перечень которых входят активированное частичное тромбопластиновое время, фибриноген, протромбиновое время.

При наличии хронических заболеваний у женщины в анамнезе после КС оценивают в динамике лабораторные

показатели, отражающие состояние функциональной активности задействованных в процессе органов [12–14].

Для определения наличия и степени генерализации инфекции хирургической акушерской раны после КС большое значение имеет определение в сыворотке крови концентрации прокальцитонина. По имеющимся научным данным прокальцитонин является маркером присоединения бактериальной инфекции [12–14].

Данный факт подтвержден также в работе Меджидовой Д.Р., которая показала, что концентрация прокальцитонина <0,5 нг/мл позволяет исключить родильниц после КС из группы высокого риска развития сепсиса и генерализации инфекции. Концентрация прокальцитонина от 0,5 до 2,0 нг/мл требует проведения исследования в динамике на фоне лечения [15].

Результаты исследования Шукиной Н.А. показывают, что уровень прокальцитонина от 0,5 до 2 нг/мл при слабо выраженных воспалительных признаках коррелирует с наличием астенического синдрома. Морфологически это соответствует локальному некрозу в зоне рубца при вялотекущем эндометрите. Концентрация прокальцитонина от 2 до 10 нг/мл в исследовании клинически коррелировала с наличием выраженного воспалительно-интоксикационного синдрома, с возобновляющейся лихорадкой после отмены антибактериальной терапии [16].

Также по исследованию Серова В.Н. и соавт. доказано, что присоединение бактериальной инфекции можно определить не только по уровню прокальцитонина, но и по снижению лейкоцитов в крови. Лейкопения, по их мнению, является плохим прогностическим признаком. Ее наличие в крови у пациентки свидетельствует не только о присоединении бактериальной инфекции, но может быть признаком начала септического процесса. Подтверждающими лабораторными критериями развития у женщин после оперативных родов несостоятельности швов, по данным рассматриваемого исследования, являются повышение скорости оседания эритроцитов (>20 мм/ч), концентрации СРБ (до 72,3 г/л), умеренная анемия (средний показатель уровня гемоглобина – 97,8 г/л) [17].

По мнению Ивашовой О.С. и некоторых других исследователей, при тяжелых формах послеродовой инфекции преобладают системные нарушения, например тяжелые нарушения гемостаза, проявляющиеся формированием тромбоза вен матки и магистральных сосудов малого таза. В основе данных нарушений, как считают авторы, лежит системный воспалительный ответ – своеобразное генерализованное внутрисосудистое воспаление, приводящее к повреждению эндотелия и развитию полиорганной недостаточности [18–20].

Немаловажное значение в патогенезе развития инфекции хирургической акушерской раны после КС у родильниц играет состояние иммунитета. По данным Гуртовой Б.Л. и соавт., во время беременности, особенно ближе к ее концу, и в ранние сроки послеродового периода у женщин имеет место транзиторный иммунодефицит, что создает условия для развития гнойно-воспалительных заболеваний в послеродовом периоде. Компенсация иммунодефицита после КС происходит лишь к десятому дню [21, 22].

По данным Подгорной А.В. и соавт., нарушение клеточного и гуморального иммунитета, которое проявляется в из-

менении содержания в сыворотке крови отдельных классов иммуноглобулинов (G, A, M), снижении общего числа Т- и В-лимфоцитов, изменении функциональной активности Т-клеток, приводит к развитию вторичного иммунодефицита. Данное состояние формирует в организме женщины повышенную восприимчивость к инфекции [23].

Кроме того, при тяжелых формах послеродовой инфекции преобладают иммунные нарушения с поражением рецепторного звена. Появляется избыточная продукция аутоантител к рецепторам γ -интерферона, блокирующих данные рецепторы [22, 23]. Зарубежные исследователи считают, что блокирование рецепторов γ -интерферона аутоантителами у данной категории женщин является компенсаторным защитным механизмом, необходимым для устранения эффекта возможного дополнительного выброса цитокина, который может привести к развитию септического шока [24–26].

Инфекция хирургической акушерской раны после оперативных родов всегда обусловлена бактериальной контаминацией. Большое значение имеют не только вирулентность возбудителя, но и массивность заражения, состояние входных ворот и первичного очага инфекции. Для своевременного начала терапии необходимо знать точную этиологию гнойно-воспалительных осложнений. Оценить данные показатели предоставляется возможным с помощью микробиологической диагностики [27, 28].

По данным Коробкова Н.А. и соавт., в настоящее время ведущее место в этиологии гнойно-воспалительных инфекций в акушерстве занимает как стафилококк, так и аэробная условно-патогенная грамотрицательная микрофлора: синегнойная палочка, эшерихии, протей, клебсиелла [29]. По данным других работ, микрофлора генитального тракта может быть представлена микоплазмами, хламидиями, стрептококком группы В. В таком случае значительно повышается частота цервикальной недостаточности [30, 31]. Также прослеживается прямая зависимость между степенью микробной обсемененности и тяжестью клинического течения сопутствующего заболевания [30, 31].

В работе Бычкова И.В. и соавт. показано, что среди возбудителей инфекции хирургической акушерской раны после КС наиболее часто встречаются кишечная палочка (33,0%) и протей (33,0%). Высокая частота встречаемости микроорганизмов кишечной группы как независимо, так и в ассоциации с другими микроорганизмами, например с золотистым стафилококком (31,0%), свидетельствует об особенностях распространения инфекции из половых путей и матки в ткани брюшной стенки и наоборот [32].

Учитывая высокий риск развития гнойно-септических осложнений, обусловленный микробиологическим фактором, врачи акушеры-гинекологи активно используют в клинической практике возможности современной микробиологической диагностики. У женщин с выявленной предрасположенностью к развитию микробной контаминации в обязательном порядке проводят забор биологического материала из влагалища, цервикального канала и послеоперационного шва на микрофлору и чувствительность к антибиотикам [33].

С целью ранней идентификации присоединения сопутствующей патологии мочевыделительной системы целесообразно проводить также микробиологическое исследование средней порции мочи у беременной женщины. Количество

выявленных микроорганизмов свидетельствует о наличии бессимптомной бактериурии. Раннее выявление и проведение терапии бактериурии снижает риск развития пиелонефрита, преждевременных родов и задержки роста плода, что, в свою очередь, снижает риски развития инфекции хирургической акушерской раны после КС. Достоверным признаком развившегося послеродового гнойно-воспалительного заболевания является выделение этиологически значимых микроорганизмов в количестве $\geq 10^4$ КОЕ/мл [13, 14, 28].

Решение о микробиологической диагностике очага инфекции у женщины после КС (шва на передней брюшной стенке, половых путей и др.) в лечебно-профилактических учреждениях реализуется несколькими способами, а возможности зависят от оснащенности лаборатории.

Например, в лабораториях второго и третьего уровней идентификацию микроорганизмов проводят с использованием современных методов диагностики, в том числе MALDI-TOF масс-спектрометрии, ставшей альтернативой трудоемкому и требующему временных затрат стандартному бактериологическому методу [34]. Определение антибиотикочувствительности осуществляют стандартным методом дисков или при помощи современных бактериологических анализаторов, например на бактериологическом анализаторе Vitek2 Compact (BioMerieux, Франция) с использованием карт VITEK®2 GN (идентификация ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных бактерий), VITEK®2 GP (идентификация грамположительных бактерий), VITEK®2 YST (идентификация дрожжевых грибов и дрожжеподобных микроорганизмов) [34, 35].

Использование современных бактериологических анализаторов обладает рядом преимуществ перед стандартными бактериологическими методами и позволяет более быстро и широко, по видовой принадлежности, проводить бактериологическую диагностику, а также дает возможность одновременного определения чувствительности к антибиотикам с оценкой остаточной антимикробной активности и более точного расчета концентрации вводимого антибиотика [28, 34, 35].

Таким образом, для оценки состояния женщин после КС на предмет риска развития инфекции хирургической акушерской раны необходимо учитывать комплекс клинико-лабораторных факторов. Среди значимых клинических факторов риска, по данным научных исследований, на развитие инфекции хирургической акушерской раны со стороны общего анамнеза женщины влияют хронические заболевания органов дыхания, пищеварения, а также нарушения функции щитовидной железы. Со стороны гинекологического анамнеза – воспалительные заболевания половых путей до и во время беременности в виде цервицита и вагинита. Со стороны акушерского анамнеза – самопроизвольные аборт, тяжелое течение родов, а также пациентки с длительным (>6 ч) «безводным» промежутком и тяжелой преэклампсией.

Среди лабораторных факторов целесообразно контролировать в динамике показатели развернутого анализа крови, СРБ, прокальцитонина.

С целью быстрого назначения эффективной антибактериальной терапии и контроля лечения необходимо в динамике выполнять посевы биологического материала на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам. Эффективность

проводимого лечения также будет зависеть от иммунного статуса пациентки и грамотной его коррекции.

Комплексный анализ инфекции хирургической раны после КС на ранней стадии ее развития с использованием современных методов диагностики будет способствовать более быстрому разрешению осложнения, сокращению длительности госпитализации, а также сохранению репродуктивной функции женщины.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The work was carried out within the framework of budget financing

Конфликт интересов

Авторы заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Потапова МЮ. Оптимизация интра- и послеоперационной антибиотикопрофилактики у женщин с рубцом на матке после кесарева сечения. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2018, 24 с.
2. Павлова ТЮ. Пути снижения частоты повторного кесарева сечения в республике Саха (Якутия). Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Саха, 2012, 24 с.
3. Щукина НА, Благина ЕИ, Баранова ИВ. Причины формирования и методы профилактики несостоятельного рубца на матке после кесарева сечения. Альманах клинической медицины. 2015;37:85-92.
4. Савельева ГМ, Караганова ЕЯ. Кесарево сечение. Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. 2015;1(2):23-9.
5. Агарев АЕ, Здольник ТД, Коваленко МС, Зотов ВВ. Прогнозирование развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, у родильниц. Российский медико-биологический вестник им. академика И.П.Павлова. 2017;25(4):565-74. DOI: 10.23888/PAVLOVJ20174565-574
6. Коробков НА. Клинико-бактериологическая характеристика послеродовых гнойно-воспалительных заболеваний. Журнал акушерства и женских болезней. 2015;64(4):78-84.
7. Егорова АТ, Глебова ТК, Моисеевко ДА, Шапошникова ЕВ. Гнойно-воспалительные осложнения в акушерской практике по материалам краевой клинической больницы г. Красноярск. Сибирское медицинское обозрение. 2015;(4):94-7.
8. Краснопольский ВИ, Буянова СН, Щукина НА, Логутова ЛС. Несостоятельность шва (рубца) на матке после кесарева сечения: проблемы и решения (редакционная статья). Российский вестник акушера-гинеколога. 2015;15(3):4-8.
9. Ткаченко ЛВ, Углова НД, Свиридова НИ, Складановская ТВ. Современный подход к лечению вульвовагинальных инфекций. Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. 2018;4(22):52-8. DOI: 10.24411/2303-9698-2018-14006
10. Мухлынина ИА, Тен АР, Якушев АМ. Инфекционные осложнения кесарева сечения. Междисциплинарные исследования: опыт прошлого, возможности настоящего, стратегии будущего. 2021;4:29-35.
11. Рыбалка АН, Сулима АН, Яковчук ЕК, Дига МА. Хронический эндометрит: пути решения проблемы (обзор литературы). Современная медицина: актуальные вопросы. 2016;4(5):47-54.

12. Мальцева ЛИ, Шарипова РИ. Хронический эндометрит – новое время, новые подходы к лечению. *Практическая медицина*. 2019;17(4):15-9.
13. Клинические рекомендации «Септические осложнения в акушерстве». М., 2011, 59 с.
14. Клинические рекомендации «Кесарево сечение в современном акушерстве» (методическое письмо Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 24 июня 2011, №15-4/10/2-6139). М., 2011.
15. Меджидова ДР, Маршалов ДВ, Петренко АП, Шифман ЕМ. Периоперационные и отдаленные осложнения при кесаревом сечении: систематический обзор. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2020; 1:9-17.
16. Щукина НА, Благина ЕИ, Баранова ИВ. Причины формирования и методы профилактики несостоятельного рубца на матке после кесарева сечения. *Альманах клинической медицины*. 2015;37:85-92.
17. Серов ВН, Сухих ГТ, Баранов ИИ. Неотложные состояния в акушерстве. М.: «ГЭОТАР-Медиа»; 2011, 784 с.
18. Ивашова ОН, Лебедева ОП, Пахомов СП. Антимикробные пептиды в патогенезе инфекционных осложнений в акушерстве и гинекологии. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2014;63(5):73-81.
19. Стрижаков АН, Пауков ВС, Чурганова АА, Соломахина МА, Кириллов ЮА, Герасимов АН, и др. Новый метод повышения качества рубца на матке после кесарева сечения. *Вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии*. 2013;12(1):9-15.
20. Jastrow N, Chaillet N, Roberge S, Morency AM, Lacasse Y, Bujold E. Sonographic lower uterine segment thickness and risk of uterine scar defect: a systematic review. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010 Apr;32(4):321-327. DOI: 10.1016/S1701-2163(16)34475-9
21. Гуртова БЛ, Ванько ЛВ, Касабулатов НМ. Клинико-иммунологические особенности родильниц с послеродовым эндометритом. *Акушерство и гинекология*. 2006;1:30-4.
22. Евсеева МП, Густоварова ТА, Киракосян ЛС. Фертильность и менструальная функция после органосохраняющих операций в современном акушерстве. *Смоленский медицинский альманах*. 2019;3:49-53.
23. Подгорная АВ, Махмутходжаев АШ, Кох ЛИ, Михеенко ГА, Юрьев СЮ. Неспецифический иммунитет влагалища у беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом. *Современные проблемы науки и образования*. 2017;1:14-9.
24. Naji O, Daemen A, Abdallah Y, Smith A, Pexsters A, Stalder S, et al. Longitudinal measurements of Caesarean section scar size and residual myometrial thickness in pregnancy as predictors of scar appearance at repeat Caesarean delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;1:38-48.
25. Mascarello KC, Horta BL, Silveira MF. Maternal complications and cesarean section without indication: systematic review and meta-analysis. *Rev Saude Publica*. 2017;51:105. DOI: 10.11606/S1518-8787.2017051000389
26. Sparić R, Mirković L, Ravilić U, Janjić T. Obstetric complications of placenta previa percreta. *Vojnosanit Pregl*. 2014 Dec;71(12):1163-6. DOI: 10.2298/vsp1412163s
27. Краснопольская КВ, Попов АА, Чечнева МА. Прегавидарная метропластика по поводу несостоятельного рубца на матке после кесарева сечения: влияние на естественную фертильность и результаты ЭКО. *Проблемы репродукции*. 2015;3(21):56-62.
28. Боронина ЛГ, Блинова СМ, Саматова ЕВ, Жилин АВ. Этиологическая структура и антибиотикорезистентность основных возбудителей гнойно-септических заболеваний родильниц и новорожденных. *Русский медицинский журнал*. 2016;5:336-9.
29. Коробков НА. Микробиологическая диагностика послеродового эндометрита. *Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова*. 2013;3:80-6.
30. Naji O, Daemen A, Smith A, Abdallah Y, Saso S, Stalder C, et al. Changes in Caesarean section scar dimensions during pregnancy: a prospective longitudinal study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 May;41(5):556-62. DOI: 10.1002/uog.12334
31. Савельев ВС, Гельфанд БР, Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение. М.: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2011, 352 с.
32. Бычков ИВ, Шамарин СВ, Бычков ВИ. Состояние фетоплацентарной системы у женщин с неполноценным рубцом на матке. *Детская медицина Северо-Запада*. 2011;2(3):10-2.
33. Перепелова ТА. Клинико-морфологическая оценка состояния послеоперационного рубца на матке и экспериментальное исследование сетчатых эндопротезов для его укрепления (клинико-экспериментальное исследование). Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Курск, 2016, 24 с.
34. Припутневич ТВ, Мелкумян АР. Масс-спектрометрия – новое слово в клинической микробиологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;2(4):842-8. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848
35. Лебедев АТ, Артеменко КА, Самгина ТЮ. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. М.: Техносфера; 2012, 157 с.

References

1. Potapova MYu. Optimization of intra- and postoperative antibiotic prophylaxis in women with a uterine scar after caesarean section. Diss. Rostov-on-Don, 2018, 24 p. (In Russian).
2. Pavlova TYu. Ways to reduce the frequency of repeated caesarean section in the Republic of Sakha (Yakutia). Diss. Sakha, 2012, 24 p. (In Russian).
3. Shchukina NA, Blagina EI, Baranova IV. Causes of inefficient uterine scarring after caesarean section and methods of its prevention. *Almanac of Clinical Medicine*. 2015;37:85-92. (In Russian).
4. Saveleva GM, Karaganova EYa. Cesarean section. *Obstetrics and Gynecology. News, Opinions, Training*. 2015;1(2):23-9. (In Russian).
5. Agarev AE, Zdolnik TD, Kovalenko MS, Zotov VV. Forecasting of development of healthcare-associated infections in puerperas. *I.P.Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2017;25(4):565-74. DOI: 10.23888/PAVLOVJ20174565-574 (In Russian).
6. Korobkov NA. Clinical and bacteriological feature postpartum purulent-inflammatory diseases. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2015;64(4):78-84. (In Russian).
7. Egorova AT, Glebova TK, Maiseenko DA, Shaposhnikova EV. Pyoinflammatory complications in obstetric practice according to the materials of the regional clinical hospital of Krasnoyarsk. *Siberian Medical Review*. 2015;(4):94-7. (In Russian).
8. Krasnopolsky VI, Buyanova SN, Shchukina NA, Logutova LS. Uterine suture (scar) incompetence after cesarean section: problems and solutions (an editorial). *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*. 2015;15(3):4-8. (In Russian).
9. Tkachenko LV, Uglova ND, Sviridova NI, Skladanovskaya TV. Modern approach to the treatment of vulvovaginal infections. *Obstetrics and Gynecology. News, Opinions, Training*. 2018;4(22):52-8. DOI: 10.24411/2303-9698-2018-14006 (In Russian).
10. Mukhlynina IA, Ten AR, Yakushev AM. Infektsionnye oslozhneniya kesareva secheniya. *Mezhdistsiplinarnye issledovaniya: opyt proshlogo, vozmozhnosti nastoyashchego, strategii budushchego*. 2021;4:29-35. (In Russian).
11. Rybalka AN, Sulima AN, Yakovchuk EK, Dizha MA. Chronic endometritis: the solutions to the problem (literature review). *Sovremennaya meditsina: aktual'nye voprosy*. 2016;4(5):47-54. (In Russian). 2016;4(5):47-54. (In Russian).
12. Maltseva LI, Sharipova RI. Chronic endometritis - new time, new approaches to treatment. *Practical Medicine*. 2019;17(4):15-9. (In Russian).
13. Clinical recommendations "Septic complications in obstetrics". Moscow, 2011, 59 p. (In Russian).

14. Clinical recommendations "Caesarean section in modern obstetrics" (methodical letter of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation dated June 24, 2011, No 15-4/10/2-6139). Moscow, 2011. (In Russian).
15. Medzhidova DR, Marshalov DV, Petrenko AP, Shifman EM. Perioperative and long-term cesarean section complications: a systematic review. *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2020;1:9-17. (In Russian).
16. Shchukina NA, Blagina EI, Barinova IV. Causes of inefficient uterine scarring after caesarean section and methods of its prevention. *Almanac of Clinical Medicine*. 2015;37:85-92. (In Russian).
17. Serov VN, Sukhikh GT, Baranov II. Neotlozhnye sostoyaniya v akusherstve. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ.; 2011, 784 p. (In Russian).
18. Ivashova ON, Lebedeva OP, Pakhomov SP, Rudyh NA, Seliverstova MS. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of infectious complications in obstetrics and gynecology. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2014;63(5):73-81. (In Russian).
19. Strizhakov AN, Paukov VS, Churganova AA, Solomakhina MA, Kirillov YuA, Gerasimov AN, et al. A new method of enhancing the quality of a uterine scar after caesarean section. *Vopr. ginek. akus. perinatol. (Gynecology, Obstetrics and Perinatology)*. 2013;12(1):9-15. (In Russian).
20. Jastrow N, Chaillet N, Roberge S, Morency AM, Lacasse Y, Bujold E. Sonographic lower uterine segment thickness and risk of uterine scar defect: a systematic review. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010 Apr;32(4):321-327. DOI: 10.1016/S1701-2163(16)34475-9
21. Gurtova BL, Van'ko LV, Kasabulatov NM. Kliniko-immunologicheskie osobennosti rodil'nits s poslerodovym endometritom. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2006;1:30-4. (In Russian).
22. Evseeva MP, Gustovarova TA, Kirakosyan LS. Fertility and menstrual function after organ-saving operations in present obstetrics. *Smolenskii meditsinskii al'manakh*. 2019;3:49-53. (In Russian).
23. Podgornaya AV, Makhmutkhodzhaev ASH, Kokh LI, Mikheenko GA, Yurev SYu. The vaginal innate immunity of pregnant women with recurrent bacterial vaginosis. *Modern Problems of Science and Education*. 2017;1:14-9. (In Russian).
24. Naji O, Daemen A, Abdallah Y, Smith A, Pexsters A, Stalder S, et al. Longitudinal measurements of Caesarean section scar size and residual myometrial thickness in pregnancy as predictors of scar appearance at repeat Caesarean delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;1:38-48.
25. Mascarello KC, Horta BL, Silveira MF. Maternal complications and cesarean section without indication: systematic review and meta-analysis. *Rev Saude Publica*. 2017;51:105. DOI: 10.11606/S1518-8787.2017051000389
26. Sparić R, Mirković L, Ravilić U, Janjić T. Obstetric complications of placenta previa percreta. *Vojnosanit Pregl*. 2014 Dec;71(12):1163-6. DOI: 10.2298/vsp1412163s
27. Krasnopol'skaya KV, Popov AA, Chechneva MA, Fedorov AA, Ershova IYu. Preconceptional methroplastic operation in patients with uterine scar incompetence after caesarian section: the influence on natural fertility and IVF outcomes. *Russian Journal of Human Reproduction / Problemy Reproduktsii* 2015;3(21):56-62. (In Russian).
28. Boronina LG, Blinova SM, Samatova EV, Zhilin AV. Etiologicheskaya struktura i antibiotikorezistentnost' osnovnykh vozбудitelei gnoino-septicheskikh zabolevaniy rodil'nits i novorozhdennykh. *RMJ (Russian Medical Journal)*. 2016;5:336-9. (In Russian).
29. Korobkov NA. Microbiological diagnosis of postpartum endometritis. *The Scientific Notes of the Pavlov University* 2013;3:80-6. (In Russian).
30. Naji O, Daemen A, Smith A, Abdallah Y, Saso S, Stalder C, et al. Changes in Cesarean section scar dimensions during pregnancy: a prospective longitudinal study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 May;41(5):556-62. DOI: 10.1002/uog.12334
31. Savelev VS, Gelfand BR. Sepsis: classification, clinical and diagnostic concept and treatment. Moscow: Medical Information Agency; 2011, 352 p. (In Russian).
32. Bychkov IV, Shamarin SV, Bychkov VI. Fetoplacental system status of the pregnant women with uterine scar defect. *Children's Medicine of the North-West* 2011;2(3):10-2. (In Russian).
33. Perepelova TA. Clinical and morphological assessment of the condition of the postoperative scar on the uterus and experimental study of mesh endoprosthesis to strengthen it (clinical and experimental study). *Diss. Kursk*, 2016, 24 p. (In Russian).
34. Pripitnevich TM, Melkumyan AR. The mass-spectrometry as a new word in clinical microbiology. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;2(4): 842-8. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848 (In Russian).
35. Lebedev AT, Artemenko KA, Samgina TYu. Osnovy mass-spektrometrii belkov i peptidov. Moscow: "Tekhnosfera" Publ.; 2012, 157 p. (In Russian).

Информация об авторе:

Богачева Наталья Викторовна, доктор медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет»

Information about author:

Natalia V. Bogacheva, MD, PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology, Kirov State Medical University

Обнаружено два новых вида экстремофильных сульфатвосстанавливающих микроорганизмов

Экспедиции микробиологов ФИЦ биотехнологии РАН к Срединно-Атлантическому хребту и на Таманский полуостров обнаружила два вида микроорганизмов-экстремофилов, способных к сульфатному дыханию. Первый относится к древним археям и живет в морском глубоководном гидротермальном источнике, второй обитает в наземном грязевом вулкане и предпочитает щелочную среду.

Микробиологи нашли два новых вида экстремофильных сульфатвосстанавливающих микроорганизмов [Электронный ресурс]. URL: <https://scientificrussia.ru/articles/mikrobiologi-nasli-dva-novyh-vida-ekstremofilnyh-sulfatvosstanavlivausih-mikroorganizmov> (дата обращения: 08.12.2021).



Правила оформления статей (основные положения)

Журнал «Бактериология» публикуется на русском языке (резюме статей и ключевые слова – на русском и английском языках), распространяется на бумажном носителе и публикуется в электронной форме.

К публикации принимаются экспериментальные и обзорные статьи, а также короткие сообщения по прикладным и фундаментальным вопросам медицинской, ветеринарной и сельскохозяйственной бактериологии. Статьи принимаются без ограничения объема от граждан любой страны на русском языке. По согласованию с редакцией допускается публикация рекламных материалов, соответствующих тематике журнала.

Публикации, созданные в порядке выполнения служебного задания, должны иметь направление от учреждения, в котором выполнена работа. В направлении следует указать, что представленный материал ранее не был нигде опубликован и не находится на рассмотрении для публикации в других изданиях (включая зарубежные).

К публикации прилагается экспертное заключение организации об отсутствии ограничений для открытой публикации представленных материалов.

Материалы для публикации, включая сопровождающие документы, направляются в редакцию в электронной форме по адресу: info@obolensk.org или bacteriology@obolensk.org. В теме сообщения следует указать «Бактериология».

Требования к оформлению статьи.

Экспериментальная статья должна состоять из разделов: введение, материалы и методы, результаты и обсуждение, список литературы.

Рукопись должна быть подготовлена в текстовом редакторе MS Word, шрифт – Times New Roman, размер – 14, межстрочный интервал – 1,5, поля – 2 см. Статья должна включать резюме и ключевые слова на русском и английском языках. Нумерация всех страниц рукописи сквозная.

Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

Статья должна быть подписана всеми авторами, включая иностранных.

К статье следует приложить сведения об авторах на русском и английском языках с указанием адреса, контактных телефонов (служебного и мобильного), факса и электронной почты с указанием автора, ответственного за переписку с редакцией.

Заглавие статьи оформляется следующим образом:

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

И. И. Иванов*, П. П. Петров**

*Первая организация, г. Москва, РФ

**Вторая организация, Техас, США

E-mail

[далее текст аннотации и ключевые слова]

Текст статьи, включая резюме, список литературы, подписи к рисункам и таблицы, должны быть оформлены одним файлом, а каждый рисунок – отдельным файлом.

РЕЗЮМЕ статьи должно быть представлено на русском и английском языках, отражать основные полученные результаты и содержать не более 250 слов.

КЛЮЧЕВЫХ СЛОВ (словосочетаний) должно быть не более 10, на русском и английском языках.

Во ВВЕДЕНИИ (без заголовка) следует изложить мотивацию написания данной работы и отдельным абзацем обозначить цель исследования. Дополнительно на английском языке.

Раздел МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ должен содержать сведения об объекте исследования (включая источник получения, название коллекции) и краткое описание использованных методик, позволяющее их воспроизвести (на ранее опубликованные и общеизвестные методы дается ссылка); для приборов и реактивов указываются название фирмы на языке оригинала в кавычках и страны в скобках.

Следует использовать общепринятые современные сокращения мер, физических, химических и математических величин, терминов и т.д. Единицы измерения должны даваться в единицах СИ (Система Интернациональная). Обозначения мутантных и рекомбинантных форм микроорганизмов следует приводить в соответствии с международными правилами. Для трехбуквенного обозначения генов бактерий используют строчные буквы (курсив).

Рисунки и таблицы размещаются в тексте статьи в соответствии с пожеланиями авторов. Кроме того, черно-белые и цветные рисунки (в формате *.jpg) прилагаются к статье в виде отдельных файлов (ris1.jpg, ris2.jpg и т.д.)

Сведения о финансовой поддержке работы приводятся в конце текста статьи перед списком литературы.

В СПИСКЕ ЛИТЕРАТУРЫ указываются авторы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Для названия журналов используются общепринятые сокращения (<http://www.nlm.nih.gov/>).

В случае невыполнения настоящих правил оформления статья не принимается и отсылается авторам на доработку.

Редакция оставляет за собой право редактировать статьи по согласованию с автором.

Присланные в редакцию статьи проходят процедуру рецензирования. В случае отклонения статьи редакция направляет автору мотивированный отказ.

Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:
142279, Московская обл.,
Серпуховский р-н, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ
Тел. (4967) 36-00-46
Факс (4967) 36-00-10
E-mail: info@obolensk.org
или
bacteriology@obolensk.org