

Научная статья
УДК 579.6
EDN: PYXFZL
DOI: 10.21285/achb.903



Исследование антибиотического действия неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в отношении грамположительных бактерий

Я.В. Устинская✉, М.С. Темнов, М.А. Еськова, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий

Тамбовский государственный технический университет, г. Тамбов, Российская Федерация

Аннотация. Работа посвящена исследованию антибактериальных свойств неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на грамположительные бактерии, определению минимальных ингибирующих концентраций смеси и отдельных веществ-метаболитов, входящих в состав экстракта. Установлена закономерность влияния освещения на интенсивность антибиотического воздействия неполярного экстракта микроводорослей в отношении грамположительных бактерий. Смесь веществ, извлеченных из дезинтегрированных клеток биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, оказывает ингибирующее действие на рост бактерий при уровне фотосинтетически активной радиации 100 ± 6 мкмоль фотонов/(м²×с). Минимальное эффективное количество экстракта составляет $330 \pm 11,09$ мкг. При анализе химической структуры компонентов неполярной фракции, извлеченной из клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, установлено, что в состав неполярного экстракта входят триацилглицериды, жирные кислоты, о-диалкилмоноглицериды и эфиры стеринных или эфирных восков, или триалкиловые эфиры глицерина. При исследовании антибиотических свойств отдельных фракций веществ обнаружено, что антибиотическим действием в отношении грамположительных бактерий обладают триацилглицериды и жирные кислоты. При этом минимальное эффективное количество триацилглицеридов составляет $400 \pm 13,37$ мкг, жирных кислот – $600 \pm 20,05$ мкг. Совместное воздействие смеси веществ неполярного экстракта дает наиболее выраженный антибиотический эффект в отношении грамположительных бактерий при уровне фотосинтетически активной радиации 100 ± 6 мкмоль фотонов/(м²×с). Таким образом, продемонстрировано усиление антибактериального действия при использовании смеси веществ неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* при уровне фотосинтетически активной радиации 100 ± 6 мкмоль фотонов/(м²×с).

Ключевые слова: микроводоросли, липиды, грамположительные бактерии, антибиотический эффект

Благодарность. Авторы выражают глубокую благодарность кандидату биологических наук старшему научному сотруднику Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН М.А. Синетовой за предоставление штамма микроводорослей.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-4348.2022.4).

Для цитирования: Устинская Я.В., Темнов М.С., Еськова М.А., Меронюк К.И., Дворецкий Д.С. Исследование антибиотического действия неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в отношении грамположительных бактерий // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 1. С. 99–107. DOI: 10.21285/achb.903. EDN: PYXFZL.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Antibiotic study of non-polar microalgae extract *Chlorella sorokiniana* against gram-positive bacteria

Yana V. Ustinskaya✉, Mikhail S. Temnov, Maria A. Eskova,
Kirill I. Meronyuk, Dmitry S. Dvoretzky

Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation

Abstract. A study of the antibacterial properties of a non-polar extract of microalgae *Chlorella sorokiniana* on gram-positive bacteria is presented along with a determination of the minimum inhibitory concentrations of the

© Устинская Я.В., Темнов М.С., Еськова М.А., Меронюк К.И., Дворецкий Д.С., 2024

mixture and the individual metabolites that make up the extract. A regular effect of illumination on the intensity of the antibiotic effect of non-polar microalgae extract on gram-positive bacteria is demonstrated. A mixture of substances extracted from disintegrated cells of the microalgae biomass *Chlorella sorokiniana* has an inhibitory effect on bacterial growth at a photosynthetically active radiation level of $100 \pm 6 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \times \text{s})$. The minimum effective amount of the extract is $330 \pm 11.09 \mu\text{g}$. When analysing the chemical structure of the components of the non-polar fraction extracted from the cells of microalgae *Chlorella sorokiniana*, the composition of the non-polar extract was shown to include triacylglycerides, fatty acids, o-dialkyl monoglycerides and ethers of sterols or waxes, or trialkyl esters of glycerol. When studying the antibiotic properties of individual fractions of substances, triacylglycerides and fatty acids were found to have an antibiotic effect on gram-positive bacteria. In this case, the minimum effective amount of triacylglycerides is $400 \pm 13.37 \mu\text{g}$, while that of fatty acids is $600 \pm 20.05 \mu\text{g}$. The combined effect of a mixture of non-polar extract substances gives the most pronounced antibiotic effect on gram-positive bacteria at a photosynthetically active radiation level of $100 \pm 6 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \times \text{s})$. Thus, an increase in antibacterial action was demonstrated when using a mixture of substances of the non-polar extract of microalgae *Chlorella sorokiniana* at a photosynthetically active radiation level of $100 \pm 6 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \times \text{s})$.

Keywords: microalgae, lipids, gram-positive bacteria, antibiotic effect

Acknowledgements. The authors are deeply grateful to M.A. Sinetova, Cand. Sci. (Biology), a senior researcher at the Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, for providing the microalgae strain.

Funding. This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – candidates of sciences (МК-4348.2022.4).

For citation: Ustinskaya Ya.V., Temnov M.S., Eskova M.A., Meronyuk K.I., Dvoretzky D.S. Antibiotic study of non-polar microalgae extract *Chlorella sorokiniana* against gram-positive bacteria. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(1):99-107. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.903. EDN: PYXFZL.

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с долгосрочным прогнозом научно-технологического развития России в области биотехнологий, одним из ключевых направлений промышленной биотехнологии Российской Федерации является создание научно-технологического задела в области биосинтеза биологически активных клеточных метаболитов¹. По данным Всемирной организации здравоохранения, устойчивость к противомикробным препаратам представляет собой глобальную угрозу для здоровья, средств к существованию и достижения целей в области устойчивого развития². В связи с этим актуальным является поиск эффективных продуцентов веществ – биологически активных соединений, обладающих антибактериальным действием. Перспективными продуцентами таких соединений являются фототрофные микроорганизмы, имеющие высокую скорость роста, гибкий метаболизм и способные быстро адаптироваться к изменяющимся условиям культивирования [1].

На сегодняшний момент лидерами по производству продуктов из микроводорослей являются такие страны, как Япония, Соединенные Штаты Америки, Мексика, Таиланд, Китай, где производство достигает более 30 тыс. тонн в год [2]. В России существует ряд предприятий, которые специализируются на производстве биологически активных веществ из биомассы фототрофных микроорганизмов: это АО «Архангельский опытный водорослевый комбинат» (AB1918, av1918.ru), ООО «Холдинвест» (Be.Live.Organic, beliveorganic.com), ООО «Х-Био» (NEWBIX, newbix.ru), ООО «Грин» (Порошок

хлореллы, chlorella-bad.ru), ООО «Компания инновационных технологий» (Микроводоросль хлорелла MIRA, chlorellamira.ru). Тем не менее активное развитие таких производств тормозится недостаточной изученностью подходов к реализации процессов основных стадий получения продуктов из биомассы, что подтверждает актуальность данных исследований [3].

Как показывают результаты проведенных ранее исследований [4–9], неполярные экстракты таких видов микроводорослей, как *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Pediastrum duplex*, *Monoraphidium arcuatum*, обладают значительной активностью в отношении целого ряда грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella ozaenae*) бактерий. Было установлено, что в составе экстрактов содержатся жирные кислоты [4, 6]. Минимальная ингибирующая концентрация липидного экстракта в отношении грамположительных бактерий варьировала в диапазоне 0,016–1,000 мг/мл, грамотрицательных – 0,250 мг/мл.

Авторами работ [10, 11] было установлено, что широким спектром антимикробной активности обладают триацилглицериды, среднецепочечные свободные жирные кислоты, длинноцепочечные ненасыщенные жирные кислоты и их моноглицериды.

В исследовании [12] был сделан вывод о том, что гликолипиды, содержащиеся в составе липидных экстрактов, проявляют антибактериальную активность, но механизм ингибирования жизнедеятельности бактерий этими

¹Гребенюк А.Ю., Кирпичников М.П., Матич Л.Ю., Попов В.О., Равин Н.В., Скрыбин К.Г. [и др.]. Прогноз научно-технологического развития России: 2030. Биотехнологии / под ред. Л.М. Гохберга, М.П. Кирпичникова. М., 2014. 48 с. Режим доступа: <https://issek.hse.ru/data/2014/07/15/1312461468/Biotech.pdf> (дата обращения: 27.03.2023).

²Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: WHO Press, World Health Organization, 2015. 28 p. Available from: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf [Accessed 27th March 2023].

веществами до конца не понятен. Было установлено, что неочищенный экстракт морских водорослей *Fucus evanescens*, богатый гликолипидами, имел сильную антибактериальную активность против грамотрицательных бактерий *Haemophilus influenza*, *Legionella pneumophila* и грамположительных бактерий *Cutibacterium acnes* и *Streptococcus pyogenes*. Авторы химически синтезировали основной гликолипид (моногалактозилдиацилглицерин), присутствующий в экстракте, но антибактериальный эффект изолированного вещества был ниже по сравнению со смесью липидных веществ.

По результатам обзора можно сделать вывод о том, что в настоящее время недостаточно изучено влияние светового излучения на величину минимальной ингибирующей концентрации исследуемых экстрактов, хотя все исследуемые вещества – это метаболиты фототрофов, не идентифицированы конкретные вещества, проявляющие данные свойства, и, соответственно, не предложен механизм воздействия этих веществ на бактерии, вызывающий их гибель.

В связи с этим целью данной работы являлось определение минимальной ингибирующей концентрации неполярного экстракта, извлеченного из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, в отношении грамположительных бактерий при воздействии светового излучения и в темноте, идентификация конкретных веществ из экстракта, которые проявляют антибактериальные свойства, а также объяснение механизма ингибирующего действия этих веществ на бактериальные клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлся штамм микроводорослей IPPAS C-1 *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss, полученный в Институте физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН. Характеристики штамма представлены в каталоге коллекции культур микроводорослей IPPAS³.

Для культивирования использовали питательную среду Тамия следующего состава, г/л: KNO₃ – 3,2; KH₂PO₄ – 0,2; MgSO₄ – 0,125; FeSO₄·7H₂O – 0,013 («ЛенРеактив», Санкт-Петербург, Россия) с добавлением раствора микроэлементов, г/л: MnCl₂·4H₂O – 0,8; ZnSO₄·7H₂O – 0,1; CuSO₄ – 0,8; MoO₃ – 0,018; H₃BO₃ – 0,28; NH₄VO₃ – 0,023 («ЛенРеактив», Санкт-Петербург, Россия).

Засев микроводорослей с плотной среды производили перенесением отдельных колоний со скошенного агара в колбы с питательной средой. Засев культуры в фотобиореактор производили на стационарной стадии роста внесением инокулята в объеме 10% от объема среды. Все процедуры с чистыми культурами проводили с обеспечением условий асептики.

Культивирование проводили в лабораторном фотобиореакторе объемом 5 л: образцы выращивались при температуре 30±2 °С и уровне фотосинтетически активной радиации (ФАР) 100±6 мкмоль фотонов/(м²×с); уровень pH изменялся в диапазоне 6,2–8,0; аэрация

суспензии (80 л/ч) осуществлялась газовоздушной смесью с содержанием диоксида углерода 0,03%. Выбор данных условий культивирования культуры микроводорослей обусловлен высоким соотношением ненасыщенных жирных кислот и высокой антимикробной активностью [11].

Концентрирование клеток микроводорослей осуществлялось с использованием центрифуги Sigma 2-16 РК/2-16P (Sigma, Германия) при скорости вращения 4000 об/мин в течение 10 мин.

Дезинтеграцию клеток микроводорослей в виде пасты влажностью 98–99% осуществляли с использованием фермента лизоцима в концентрации 20 мг/г в течение 4 ч и СВЧ-излучения в течение 30 с, мощность излучения 560 Вт, количество циклов воздействия 1 [13].

Сушку клеток микроводорослей для определения концентрации клеток в суспензии, г/л, осуществляли в суховоздушном шкафу HS-121A (Chirana (BMT), Словакия) при температуре 80 °С до постоянной массы (Δ = 0,01 г).

Сухую биомассу определяли по формуле

$$M = (a - b)/V,$$

где *M* – концентрация сухой биомассы, г/мл; *a* – масса центрифужной пробирки со сконцентрированной биомассой клеток микроводорослей, г; *b* – масса центрифужной пробирки без биомассы, г; *V* – объем культуральной жидкости, мл.

Экстракцию липидов из биомассы микроводорослей проводили с использованием в качестве растворителя петролейного эфира, взятого в соотношении 1 г биомассы к 20 мл эфира [14].

Очистка липидов от примесей и разделение их по фракциям осуществлялись методом тонкослойной хроматографии [15]. Анализ проводился на пластинках ПТСХ-АФ-В-УФ (Sorbfil, Россия) с использованием элюирующей системы «петролейный эфир – этиловый эфир – уксусная кислота». Идентификацию проводили по положению зон адсорбции на хроматограмме при просмотре в ультрафиолетовом свете.

Анализ жирных кислот триацилглицеридов, содержащихся в экстракте микроводорослей, проводился с использованием газового хроматографа «Кристаллюкс-4000М» (НПФ «Мета-хром», Россия).

Для определения чувствительности бактерий к внутриклеточным метаболитам микроводорослей использовали диско-диффузионный метод. В качестве тест-культуры (рис. 1) использовались бактерии, выделенные в лаборатории «Пищевые технологии и биотехнология» Тамбовского государственного технического университета при помощи седиментационного метода (метода Коха)⁴: грамположительные, палочковидные размером (0,5–2,5)×(1,2–10,0) мкм, аэробы, на мясо-пептонном агаре образующие гладкие колонии беловатого цвета. Полученная бактериальная культура была исследована на предмет определения таксономической принадлежности в Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии РАН» Центра

³*Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss // IPPAS C-1. Режим доступа: https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/IPPAS%20C-1.html (дата обращения: 27.03.2023).

⁴Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. Т. 1. 448 с.

коллективного пользования «Биоинженерия». Установлено, что культура не является аксеничной, доминирующий компонент образца, вероятнее всего, принадлежит к роду *Bacillus*.

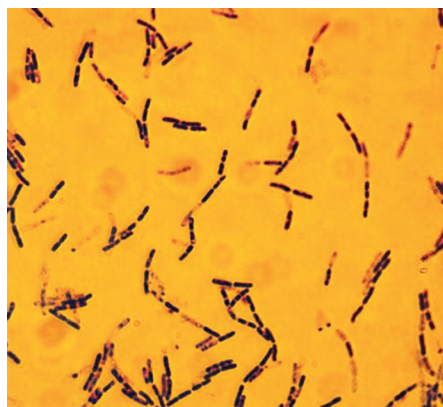


Рис. 1. Микрография грамположительных бактерий (увеличение 1200х)

Fig. 1. Micrograph of gram-positive bacteria (1200x)

Определение таксономической принадлежности осуществлялось согласно методикам, описанным в источниках [16–18].

Вещества наносились на диски размером 5 мм. Диски помещались на чашки Петри со средой Мюллера – Хинтона (толщина слоя агар в чашке $4,0 \pm 0,5$ мм) в трех повторениях. Антибиотические свойства неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* проверялись в темноте и при уровне ФАР 100 ± 6 мкмоль фотонов/(м²×с). Рассчитывались зона ингибирования каждого диска и средний диаметр зоны ингибирования. В качестве положительного контроля использовался антибиотик азитромицин в количестве 15 мкг – стандартный диск (Научно-исследовательский центр фармакотерапии, Санкт-Петербург, Россия), в качестве отрицательного контроля – петролейный эфир.

Исследование антибиотических свойств отдельных фракций неполярного экстракта микроводорослей

осуществлялось с помощью метода лунок согласно методике, описанной в работе Н.С. Егорова⁵. На первом этапе эксперимента стерильным инструментом в среде Мюллера – Хинтона (толщина слоя агар в чашке $4,0 \pm 0,5$ мм), залитой в чашки Петри, проделывались лунки размером 6 мм. Затем в чашку Петри на питательную среду с проделанными лунками вносилось 50 мкл грамположительных бактерий с концентрацией $99,9 \times 10^6$ КОЕ/мл. Далее в лунки вносилось определенное количество отдельных фракций неполярного экстракта микроводорослей. Вещества с пластины вносились в лунки со 120 мкл петролейного эфира. Затем чашки Петри помещались в термостат на 20 ч при температуре 37 °С при освещении белым светом с уровнем ФАР 100 ± 6 мкмоль фотонов/(м²×с). Положительным контролем служил азитромицин в количестве 15 мкг. Отрицательным контролем – чистый порошок силикагеля со 120 мкл петролейного эфира. Каждый опыт эксперимента повторялся три раза.

Площадь зоны ингибирования рассчитывалась по формуле

$$S = \pi \times R^2,$$

где R – радиус зоны ингибирования, мм.

Обработка экспериментальных данных осуществлялась с использованием пакета прикладных программ MATLAB.

В табл. 1 представлен анализ результатов качественного и количественного состава веществ неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

При анализе жирнокислотного состава триацилглицеридов установлено, что в него входят как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты. Химическая структура компонентов неполярной фракции, извлеченной из клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, позволяет предположить наличие у этих соединений большого количества двойных связей (ненасыщенные жирные кислоты триацилглицеридов – олеиновая и линолевая кислоты) (рис. 2).

Таблица 1. Качественный и количественный состав неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Table 1. Qualitative and quantitative composition of microalgae *Chlorella sorokiniana* non-polar extract

Название	Концентрация жирных кислот триацилглицеридов, мг/мг липидов	Концентрация, мг/мл
Триацилглицериды:		
пентадекановая кислота (C 15:0)	0,024	47,5
пальмитиновая кислота (C 16:0)	0,039	
маргариновая кислота (C 17:0)	0,026	
стеариновая кислота (C 18:0)	0,012	
олеиновая кислота (C 18:1)	0,007	
линолевая кислота (C 18:2)	0,001	
Жирные кислоты	–	35,0
О-диалкилмоноглицериды	–	25,0
Эфиры стерина / эфиры восков / триалкиловые эфиры глицерина	–	30,0
Всего	0,110	138,0

⁵Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: учебник для студентов вузов. М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. 528 с.

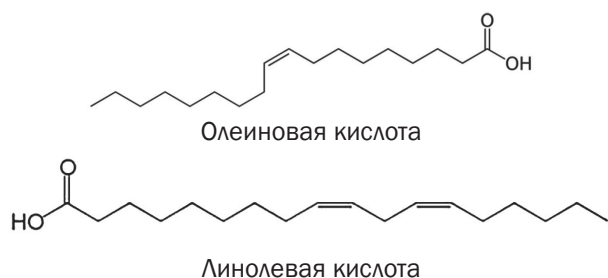


Рис. 2. Формулы жирных кислот (олеиновой и линолевой)

Fig. 2. Fatty acid formulas (oleic and linoleic)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эксперимент 1. В ходе эксперимента 1 было проведено определение минимальной ингибирующей концентрации неполярного экстракта биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в отношении смешанной культуры грамположительных бактерий.

У образца, исследуемого при уровне ФАР 100 ± 6 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \times \text{с}$), средний диаметр зоны ингибирования составил $10,0 \pm 2,0$ мм (рис. 3).

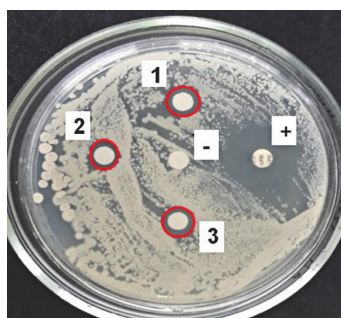


Рис. 3. 7590 мкг (фотосинтетически активная радиация 100 ± 6 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \times \text{с}$)): 1 – первый диск; 2 – второй диск; 3 – третий диск; «+» – положительный контроль; «-» – отрицательный контроль

Fig. 3. 7590 μg (photosynthetically active radiation level 100 ± 20 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \times \text{s})$): 1 – first disc; 2 – second disc; 3 – third disc; «+» – positive control; «-» – negative control

В отсутствии освещения отсутствовала и зона ингибирования (рис. 4).

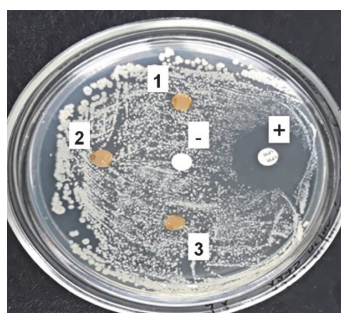
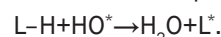


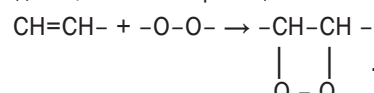
Рис. 4. 7590 мкг (фотосинтетически активная радиация 0 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \times \text{с}$)): 1 – первый диск; 2 – второй диск; 3 – третий диск; «+» – положительный контроль; «-» – отрицательный контроль

Fig. 4. 7590 μg (photosynthetically active radiation level 0 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \times \text{s})$): 1 – first disc; 2 – second disc; 3 – third disc; «+» – positive control; «-» – negative control

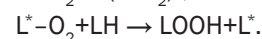
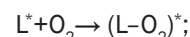
Влияние освещенности на антибиотическое действие липидов, по всей видимости, может быть объяснено теорией перекисного окисления липидов Баха – Энглера и теорией цепных разветвленных реакций Н.Н. Семёнова [19]: поток фотонов инициирует образование реактивных форм кислорода (фотоокислительный стресс), которые взаимодействуют с веществами липидной природы, происходит атака сопряженных двойных связей со стороны HO^* и HO_2^* (активные формы кислорода), что приводит к появлению липидных радикалов:



Ненасыщенные жирные кислоты с образованием циклической перекиси будут окисляться по месту двойных связей, обладающих высокой реакционной способностью:



Липидные радикалы реагируют с O_2 с образованием пероксильных радикалов, которые взаимодействуют с новыми молекулами, содержащими ненасыщенные жирные кислоты, что приводит к появлению липидных пероксидов:



Образовавшиеся липидные радикалы могут атаковать молекулы белков и нуклеиновых кислот, окислять липиды цитоплазматической мембраны, что приводит к нарушению метаболизма и гибели бактерий.

Результаты эксперимента по определению минимальной ингибирующей концентрации веществ липидной природы биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* представлены в табл. 2.

Неполярный экстракт продемонстрировал антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий культуры в диапазоне 7590–330 мкг. Минимальная ингибирующая концентрация липидного экстракта составила 13,8 мг/мл при содержании веществ на диске 330 мкг.

Эксперимент 2. В ходе эксперимента 2 было проведено определение минимальной ингибирующей концентрации отдельных фракций веществ неполярного экстракта биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в отношении смешанной культуры грамположительных бактерий.

В табл. 3 представлен анализ результатов антибиотического действия триацлглицеридов и длинноцепочечных спиртов неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Образцы исследовались при уровне ФАР 100 ± 6 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \times \text{с}$). У триацлглицеридов средний диаметр зоны ингибирования составил $13,7 \pm 0,6$ мм, у жирных кислот – $11,7 \pm 0,6$ мм (рис. 5, 6).

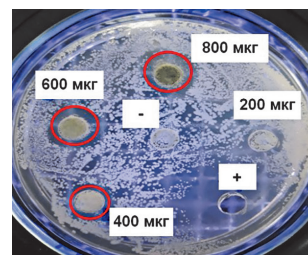


Рис. 5. Триацлглицериды: «+» – положительный контроль; «-» – отрицательный контроль

Fig. 5. Triacylglycerides: «+» – positive control; «-» – negative control

Таблица 2. Антибактериальная активность неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Table 2. Antibacterial activity of *Chlorella sorokiniana* non-polar extract

Номер образца	Содержание веществ на диске, мкг	Свет	D_{cp} , мм	S, мм ²
0	7590±254,26	-	-	-
1	7590±254,26	+	10,00±2,00	78,51±0,25
2	5380±180,29	+	9,70±2,50	73,86±0,25
3	3243±108,64	+	9,70±0,58	73,86±0,25
4	1104±36,98	+	9,70±0,58	73,86±0,25
5	552±18,49	+	8,70±0,58	59,42±0,25
6	440±14,79	+	8,00±1,00	50,24±0,25
7	330±11,09	+	6,30±0,58	31,16±0,25
8	220±7,41	+	-	-
9	110±3,71	+	-	-
10	76±2,54	+	-	-

Примечание. D_{cp} – средний диаметр зоны ингибирования и стандартное отклонение; S – площадь зоны ингибирования.

Таблица 3. Антибактериальная активность триацилглицеридов и жирных кислот микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Table 3. Antibacterial activity of triacylglycerides and fatty acids of the microalgae *Chlorella sorokiniana*

Вещество	Содержание вещества в лунке, мкг	D_{cp} , мм	S, мм ²
Триацилглицериды	1000,00±33,42	13,7±0,6	147,34±0,25
	800,00±26,73	12,7±0,6	126,61±0,25
	600,00±20,05	12,0±0,0	113,04±0,25
	400,00±13,37	11,0±1,0	94,98±0,25
	200,00±6,68	-	-
	150,00±5,09	-	-
	100,00±3,34	-	-
Жирные кислоты	1000,00±33,53	11,7±0,6	107,46±0,25
	800,00±26,85	11,0±1,0	94,99±0,25
	600,00±20,05	9,0±0,0	63,59±0,25
	400,00±13,37	-	-
	200,00±6,68	-	-

Примечание. D_{cp} – средний диаметр зоны ингибирования и стандартное отклонение; S – площадь зоны ингибирования и погрешность отсчета.

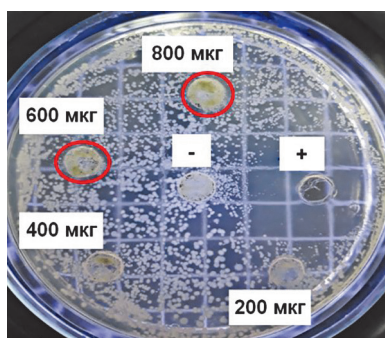


Рис. 6. Жирные кислоты: «+» – положительный контроль; «-» – отрицательный контроль

Fig. 6. Fatty acids: “+” – positive control; “-” – negative control

Смесь веществ липидной природы неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* имеет более выраженное антибиотическое действие, чем отдельные фракции веществ при уровне ФАР 100±6 мкмоль фотонов/(м²×с). Минимальное эффективное количество неполярного экстракта на

диске – 330,00±11,09 мкг. Некоторые исследования сообщают о соединениях со значением минимального эффективного количества более 1000 мкг, что имеет небольшое значение для их использования в качестве антимикробных соединений [20–22]. Так, исследования антимикробной активности этанолового экстракта из моркови показали, что за активность отвечали входящие в состав этого экстракта додекановая и пентадекановая кислоты. Минимальная ингибирующая концентрация экстракта для *Staphylococcus aureus* составляла 27000–55000 мкг [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что смесь веществ неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* оказывает ингибирующее действие на рост грамположительных бактерий на свету при уровне ФАР 100±6 мкмоль фотонов/(м²×с). В отсутствии света антибактериальный эффект отсутствовал. Установлено, что из всех веществ липидной природы, входящих в состав неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, антибактериальным действием обладают триацилглицериды и жирные кислоты.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Dolganyuk V., Belova D., Babich O., Prosekov A., Ivanova S., Katserov D., et al. Microalgae: a promising source of valuable bioproducts // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, no. 8. P. 1153. DOI: 10.3390/biom10081153.
2. Хвойников А.Н., Сангалова Е.Д., Орлова О.Ю. Тенденции и статистика развития рынка микроводорослей // Вестник Алтайской академии экономики и права. 2021. N 4-2. С. 278–282. DOI: 10.17513/vaael.1678. EDN: EPKIEH.
3. Dvoretzky D.S., Temnov M.S., Markin I.V., Ustinskaya Ya.V., Es'kova M.A. Problems in the development of efficient biotechnology for the synthesis of valuable components from microalgae biomass // *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2022. Vol. 56. P. 425–439. DOI: 10.1134/S0040579522040224.
4. Pratt R., Daniels T.C., Eiler J.J., Gunnison J.B., Kumler W.D., Oneto J.F., et al. *Chlorellin*, an antibacterial substance from *Chlorella* // *Science*. 1944. Vol. 99, no. 2574. P. 351–352. DOI: 10.1126/science.99.2574.351.
5. Sukhikh S., Prosekov A., Ivanova S., Maslennikov P., Andreeva A., Budenkova E., et al. Identification of metabolites with antibacterial activities by analyzing the FTIR spectra of microalgae // *Life*. 2022. Vol. 12, no. 9. P. 1395. DOI: 10.3390/life12091395.
6. Cepas V., Gutiérrez-Del-Río I., López Y., Redondo-Blanco S., Gabasa Y., Iglesias M.J., et al. Microalgae and cyanobacteria strains as producers of lipids with antibacterial and antibiofilm activity // *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19, no. 12. P. 675. DOI: 10.3390/md19120675.
7. Селиванова Е.А., Игнатенко М.Е., Немцева Н.В. Антагонистическая активность новых штаммов зеленых микроводорослей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. N 4. С. 72–76. EDN: UDQWPD.
8. Субботина Ю.М., Шопинская М.И. Механизм антибактериального действия фитопланктона и высшей водной растительности на процессы самоочищения сточных вод // Отходы, причины их образования и перспективы использования: сб. науч. тр. по мат. Междунар. науч. эколог. конф. (г. Краснодар, 26–27 марта 2019 г.). Краснодар: Изд-во КубГАУ, 2019. С. 441–445. EDN: WFGYCS.
9. Лысенко Ю.А., Мачнева Н.А., Борисенко В.В., Николаенко В.И. Антибактериальная активность микроводоросли // Молодой ученый. 2015. N 5-1. С. 17–20. EDN: TKLEMD.
10. Dolganyuk V., Andreeva A., Sukhikh S., Kashirskikh E., Prosekov A., Ivanova S., et al. Study of the physicochemical and biological properties of the lipid complex of marine microalgae isolated from the coastal areas of the eastern water area of the Baltic Sea // *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 18. P. 5871. DOI: 10.3390/molecules27185871.
11. Dvoretzky D.S., Dvoretzky S.I., Temnov M.S., Markin I.V., Akulinin E.I., Golubyatnikov O.O., et al. Experimental research into the antibiotic properties of *Chlorella vulgaris* algal exometabolites // *Chemical Engineering Transactions*. 2019. Vol. 74. P. 1429–1434. DOI: 10.3303/CET1974239.
12. Amiguet V.T., Jewell L.E., Mao H., Sharma M., Hudson J.B., Durst T., et al. Antibacterial properties of a glycolipid-rich extract and active principle from Nunavik collections of the macroalgae *Fucus evanescens* C. Agardh (Fucaceae) // *Canadian Journal of Microbiology*. 2011. Vol. 57, no. 9. P. 745–749. DOI: 10.1139/w11-065.
13. Темнов М.С., Устинская Я.В., Еськова М.А., Меронюк К.И., Дворецкий Д.С. Сравнительный анализ методов дезинтеграции клеток *Chlorella sorokiniana*, повышающих эффективность экстракции внутриклеточных водорастворимых белков // Известия высших учебных заведений. Серия Химия и химическая технология. 2022. Т. 65. N 4. С. 79–86. DOI: 10.6060/ivkkt.20226504.6527. EDN: ONRZQP.
14. Señoráns M., Castejón N., Señoráns F.J. Advanced extraction of lipids with DHA from *Isochrysis galbana* with enzymatic pre-treatment combined with pressurized liquids and ultrasound assisted extractions // *Molecules*. 2020. Vol. 25, no. 14. P. 3310. DOI: 10.3390/molecules25143310.
15. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / пер. с англ. М.: Мир, 1981. В 2 т. Т. 1. 616 с.
16. Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Koganova T.V., Tourova T.P., Kravchenko I.K., Bykova S.A., et al. A study of nucleotide sequences of *nifH* genes of some methanotrophic bacteria // *Microbiology*. 2002. Vol. 71, no. 4. P. 425–432. DOI: 10.1023/A:1019893526803. EDN: LHIQFR.
17. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / eds E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
18. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977. Vol. 74, no. 12. P. 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
19. Rubin A.B. *Compendium of biophysics*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. 660 p.
20. Stirk W.A., van Staden J. Bioprospecting for bioactive compounds in microalgae: antimicrobial compounds // *Biotechnology Advances*. 2022. Vol. 59. P. 107977. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.107977.
21. Coronado-Reyes J.A., Salazar-Torres J.A., Juárez-Campos B., Gonzalez-Hernandez J.C. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in biotechnology: a review // *Food Science and Technology*. 2022. Vol. 42. P. 37320. DOI: 10.1590/fst.37320.
22. Alsenani F., Tupally K.R., Chuac E.T., Eltanahy E., Alsufyani H., Parekh H.S., et al. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds // *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020. Vol. 28, no. 12. P. 1834–1841. DOI: 10.1016/j.jsps.2020.11.010.
23. Рыбин В.Г., Блинов Ю.Г. Антимикробные свойства липидов // Известия ТИИРО. 2001. Т. 129. С. 179–196. EDN: HSKZCR.

REFERENCES

1. Dolganyuk V., Belova D., Babich O., Prosekov A., Ivanova S., Katserov D., et al. Microalgae: a promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*. 2020;10(8):1153. DOI: 10.3390/biom10081153.
2. Khvoynikov A.N., Sangalova E.D., Orlova O.Yu. Trends and statistics of the microalgae market development. *Vestnik Altaiskoi akademii ekonomiki i prava*. 2021;4-2:278-282. (In Russian). DOI: 10.17513/vaael.1678. EDN: EPKIEH.
3. Dvoretzky D.S., Temnov M.S., Markin I.V., Ustinskaya Ya.V., Es'kova M.A. Problems in the devel-

opment of efficient biotechnology for the synthesis of valuable components from microalgae biomass. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2022;56:425-439. DOI: 10.1134/S0040579522040224.

4. Pratt R., Daniels T.C., Eiler J.J., Gunnison J.B., Kumler W.D., Oneto J.F., et al. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*. 1944;99(2574):351-352. DOI: 10.1126/science.99.2574.351.

5. Sukhikh S., Prosekov A., Ivanova S., Maslennikov P., Andreeva A., Budenkova E., et al. Identification of metabolites with antibacterial activities by analyzing the FTIR spectra of microalgae. *Life*. 2022;12(9):1395. DOI: 10.3390/life12091395.

6. Cepas V., Gutiérrez-Del-Río I., López Y., Redondo-Blanco S., Gabasa Y., Iglesias M.J., et al. Microalgae and cyanobacteria strains as producers of lipids with antibacterial and antibiofilm activity. *Marine Drugs*. 2021;19(12):675. DOI: 10.3390/md19120675.

7. Selivanova E.A., Ignatenko M.E. Antagonistic activity of novel green microalgae strains. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2014;4:72-76. (In Russian). EDN: UDQWPD.

8. Subboina Yu.M., Shopinskaya M.I. The mechanism of the antibacterial action of phytoplankton and higher aquatic vegetation on the processes of self-cleaning of wastewater. In: *Otkhody, prichiny ikh obrazovaniya i perspektivy ispol'zovaniya: sb. nauch. tr. po mat. Mezhdunar. nauch. ekolog. konf. = Waste, reasons for waste generation and prospects for use: Proc. of Int. Sci. Ecol. Conf.* 26–27 March 2019, Krasnodar. Krasnodar: Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin; 2019, p. 441-445. (In Russian). EDN: WFGCS.

9. Lysenko Yu.A., Machneva N.L., Borisenko V.V., Nikolaenko V.I. Microalgae antibacterial activity. *Molodoi uchenyi*. 2015;5-1:17-20. (In Russian). EDN: TKLEMD.

10. Dolganyuk V., Andreeva A., Sukhikh S., Kashirskikh E., Prosekov A., Ivanova S., et al. Study of the physicochemical and biological properties of the lipid complex of marine microalgae isolated from the coastal areas of the eastern water area of the Baltic Sea. *Molecules*. 2022;27(18):5871. DOI: 10.3390/molecules27185871.

11. Dvoretzky D.S., Dvoretzky S.I., Temnov M.S., Markin I.V., Akulinin E.I., Golubyatnikov O.O., et al. Experimental research into the antibiotic properties of *Chlorella vulgaris* algal exometabolites. *Chemical Engineering Transactions*. 2019;74:1429-1434. DOI: 10.3303/CET1974239.

12. Amiguet V.T., Jewell L.E., Mao H., Sharma M., Hudson J.B., Durst T., et al. Antibacterial properties of a glycolipid-rich extract and active principle from Nunavik collections of the macroalgae *Fucus evanescens* C.

Agardh (Fucaceae). *Canadian Journal of Microbiology*. 2011;57(9):745-749. DOI: 10.1139/w11-065.

13. Temnov M.S., Ustinskaya Ya.V., Eskova M.A., Meronyuk K.I., Dvoretzky D.S. Comparative analysis of disintegration methods of *Chlorella sorokiniana* cells that increase the efficiency of extraction of intracellular water-soluble proteins. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Seriya Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya = Chem-ChemTech*. 2022;65(4):79-86. (In Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20226504.6527. EDN: ONRZQP.

14. Señoráns M., Castejón N., Señoráns F.J. Advanced extraction of lipids with DHA from *Isochrysis galbana* with enzymatic pre-treatment combined with pressurized liquids and ultrasound assisted extractions. *Molecules*. 2020;25(14):3310. DOI: 10.3390/molecules25143310.

15. Kirchner J.V. Thin-layer chromatography; 1967, 616 p. (Russ. ed.: *Tonkosloinaya khromatografiya*. Moscow: Mir; 1981, 616 p.).

16. Boulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Koganova T.V., Tourova T.P., Kravchenko I.K., Bykova S.A., et al. A study of nucleotide sequences of *nifH* genes of some methanotrophic bacteria. *Microbiology*. 2002;71(4):425-432. DOI: 10.1023/A:1019893526803. EDN: LHIQFR.

17. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley & Sons; 1991, p. 115-175.

18. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463-5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.

19. Rubin A.B. *Compendium of biophysics*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2017, 660 p.

20. Stirk W.A., van Staden J. Bioprospecting for bioactive compounds in microalgae: antimicrobial compounds. *Biotechnology Advances*. 2022;59:107977. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.107977.

21. Coronado-Reyes J.A., Salazar-Torres J.A., Juárez-Campos B., Gonzalez-Hernandez J.C. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in biotechnology: a review. *Food Science and Technology*. 2022;42:37320. DOI: 10.1590/fst.37320.

22. Alsenani F., Tupally K.R., Chuac E.T., Eltanahy E., Alsufyani H., Parekh H.S., et al. Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020;28(12):1834-1841. DOI: 10.1016/j.jsps.2020.11.010.

23. Rybin V.G., Blinov Yu.G. Antimicrobial properties of lipids. *Izvestiya TINRO = Transactions of the Pacific Research Institute of Fisheries and Oceanography*. 2001;129:179-196. (In Russian). EDN: HSKZCR.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Устинская Яна Витальевна,
аспирант,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106,
Российская Федерация,
✉ustinskaya.yana@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8642-8558>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yana V. Ustinskaya,
Postgraduate Student,
Tambov State Technical University,
106, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
✉ustinskaya.yana@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8642-8558>

Темнов Михаил Сергеевич,
к.т.н., доцент,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106,
Российская Федерация,
temnov.mihail@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2110-1305>

Еськова Мария Александровна,
аспирант,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106,
Российская Федерация,
mashaesкова@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3511-8485>

Меронюк Кирилл Иванович,
аспирант,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106,
Российская Федерация,
mirych.87@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5774-8915>

Дворецкий Дмитрий Станиславович,
д.т.н., профессор, заведующий кафедрой,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106,
Российская Федерация,
dvoretsky@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0002-4352-810X>

Вклад авторов

Я.В. Устинская – написание текста статьи, разработка концепции исследования, проведение экспериментов, обсуждение результатов.
М.С. Темнов – разработка концепции исследования, развитие методологии, проведение экспериментов, обсуждение результатов.
М.А. Еськова, К.И. Меронюк – проведение экспериментов, обсуждение результатов.
Д.С. Дворецкий – разработка концепции исследования, развитие методологии, обсуждение результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 07.04.2023.
Одобрена после рецензирования 03.11.2023.
Принята к публикации 29.02.2024.

Mikhail S. Temnov,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Tambov State Technical University,
106, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
temnov.mihail@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2110-1305>

Maria A. Eskova,
Postgraduate Student,
Tambov State Technical University,
106, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
mashaesкова@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3511-8485>

Kirill I. Meronyuk,
Postgraduate Student,
Tambov State Technical University,
106, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
mirych.87@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5774-8915>

Dmitry S. Dvoretsky,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of the Department,
Tambov State Technical University,
106, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
dvoretsky@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0002-4352-810X>

Contribution of the authors

Yana V. Ustinskaya – research concept development, conducting experiments, discussion of the results, writing the text of the manuscript.
Mikhail S. Temnov – research concept development, methodology development, conducting experiments, discussion of the results.
Maria A. Eskova, Kirill I. Meronyuk – conducting experiments, discussion of the results.
Dmitry S. Dvoretsky – research concept development, methodology development, discussion of the results.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 07.04.2023.
Approved after reviewing 03.11.2023.
Accepted for publication 29.02.2024.