

С.Н. Козлов, В.Б. Николаев, Е.Ю. Марков, Л.Я. Урбанович, С.К. Миткеева

**ЗИМОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ *VIBRIO CHOLERAE* O1 И O139 СЕРОГРУПП**

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора», Иркутск, Россия

С помощью электрофореза и тестов радиальной энзимодиффузии с использованием различных поверхностно-активных неионных детергентов в качестве субстратов, импрегнированных в полиакриламидный и агарозный гель, изучены спектр и активность липолитических ферментов субклеточных фракций холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. В составе и активности липолитических ферментов выявлены межштаммовые различия. Зимографические методы представляют собой удобный, наглядный и простой инструмент, пригодный для сравнительного изучения состава и свойств бактериальных гидролаз.

**Ключевые слова:** зимографический анализ, субклеточные фракции, липолитические ферменты, *Vibrio cholerae*, субстратный электрофорез

**ZYMOGRAPHIC ANALYSIS OF LIPOLYTICAL ENZYMES OF SUBCELLULAR *VIBRIO CHOLERAE* FRACTIONS OF O1 AND O139 SEROGROUPS**

S.N. Kozlov, V.B. Nikolaev, E.Y. Markov, L.Y. Urbanovich, S.K. Mitkeeva

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russia

Zymographic analysis showed that all subcellular fractions of the serogroups possessed different degree of lipolytical activity. Maximal hydrolysis in the radial enzyme-diffusion reaction in agarose gel was observed in Tween-20, Tween-80, Triton X-305 and Triton X-405. Total hydrolase activity of urea extracts in Tween-20, Tween-80, Triton X-405, Span-85 excelled those in the preparations of outer membranes. Maximal lipolytical activity in regard to the Tweens was shown by the preparations of urea extracts prepared from the nontoxicogenic strains of O1 serogroups, while in relation to the Tritons – preparations of urea extracts from the toxicogenic strains ( $p < 0,05$ ).

**Key words:** zymographic analysis, subcellular fraction, lipolytical enzyme, *Vibrio cholerae*, substrate electrophoresis

**ВВЕДЕНИЕ**

Проблема холеры остается актуальной на мировом уровне в связи с продолжающимся пандемическим распространением этой инфекции в большинстве стран мира. Этот факт свидетельствует о необходимости всестороннего изучения возбудителя холеры, особенно ферментов его поверхностных структур, первоначально взаимодействующих с клетками макроорганизма. Широкое распространение у бактерий гидролитических ферментов, ассоциированных с поверхностными клеточными структурами, говорит об их участии в разнообразных физиологических процессах, а также в патогенезе многих инфекционных заболеваний, вызванных различными возбудителями, что обуславливает необходимость их изучения.

Липолитические ферменты – это ферменты, гидролизующие эфиры карбоновых кислот. Входящие в эту группу эстеразы (ЕС 3.1.1.1) расщепляют в основном эфиры короткоцепочечных жирных кислот (8 и менее углеродных атомов), липазы (ЕС 3.1.1.3) – эфиры длинноцепочечных жирных кислот (более 8 атомов углерода), фосфолипазы (ЕС 3.1.1.4–3.1.4.3) – фосфоэфирные связи в молекулах фосфолипидов. При изучении липолитических ферментов микроорганизмов следует различать способность к продукции бактериями внеклеточных гидролаз, выделяемых в культуральную жидкость (экзолипазы) [13, 14], и способность расщеплять соответствующий субстрат при непосредственном контакте с клетками, т. е. образовывать эндолипазу [7].

Всестороннее изучение микробных липолитических ферментов показало более широкий спектр

их биологических и физиологических функций. Установлено, что бактериальные липолитические ферменты играют важную роль в патогенезе многих инфекционных заболеваний [9, 15].

К настоящему времени известно, что холерный вибрион при росте на питательных средах выделяет несколько липолитических ферментов, отличающихся субстратной специфичностью и электрофоретической подвижностью [11], лизофосфолипаза L2 холерных вибрионов участвует в регуляции экспрессии холерного токсина [16]. При производстве химической холерной вакцины в её составе определяют ряд ферментов, относимых к факторам патогенности, в том числе фосфолипазы [1, 10]. Однако сведения о составе липолитических ферментов холерного вибриона в доступной литературе отсутствуют. Исследование состава и свойств липолитических ферментов холерных вибрионов позволит выявлять индивидуальные особенности разных штаммов возбудителя холеры и проводить их дифференциацию по этому признаку [5].

**Цель данной работы:** зимографический анализ липолитических ферментов субклеточных фракций *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139 серогрупп разного происхождения с помощью субстратного электрофореза и тестов радиальной энзимодиффузии в агарозном геле.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использованы штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп разной эпидемической значимости, выделенные в неблагополучные (токсигенные штаммы от больных и объектов окружающей среды) и благополучный (нетоксигенные штаммы, выделенные

из объектов окружающей среды) по холере периоды (табл. 1). Штаммы холерного вибриона выращивали на казеин-дрожжевом агаре (рН 7,6) при 37 °С в течение суток и смывали физиологическим раствором. Бактериальную массу (в концентрации 10<sup>9</sup> м. к./мл) обрабатывали стерильным 9 М раствором мочевины в соотношении 1 : 1. После суточной экспозиции при комнатной температуре проводили бактериологический контроль стерильности лизата в соответствии с «Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов» (Саратов, 1982). Во время проведения контроля лизат хранили в холодильнике при температуре 4 °С. После отрицательного контроля полученный материал фракционировали дифференциальным центрифугированием на ультрацентрифуге Spinco L2 65В (Beckman) и роторе SW28 [8]. Субклеточные фракции – мочевиновый экстракт (МЭ) и наружные мембраны (НМ) – диализовали против проточной и дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

Общую липолитическую активность субклеточных фракций изучали в тесте радиальной энзимодиффузии [6, 12] в 1%-м агарозном геле, приготовленном на 0,05 М Трис-НСl буфере (рН 8,3), содержащем 0,0125%-й раствор СаCl<sub>2</sub> и 0,5%-й раствор субстрата, в качестве которых использовали следующие неионные детергенты: Тритон X-100, Тритон X-114, Тритон X-305, Тритон X-405, Твин-20, Твин-60, Твин-80, Спан-85. После инкубации во влажной камере в течение ночи при 37 °С липолитическая активность проявлялась вокруг лунок в виде матовых ореолов – «гало», вследствие выпадения в осадок кальциевых солей жирных кислот, высвободившихся при гидролизе твинов или трито-

нов. Степень активности оценивали по размеру «гало» измерением радиуса от края лунки до края «гало». В качестве положительного контроля использовали раствор панкреатической липазы, в качестве отрицательного контроля – 0,05 М Трис-НСl буфер (рН 8,3).

Наличие и состав липолитических ферментов в субклеточных фракциях выявляли методом субстратной зимографии после электрофореза препаратов в 8 %-м и 13 %-м блоках полиакриламидного геля (ПААГ) без термообработки образцов в присутствии ДСН. Фракционирование белков проводили на приборе для вертикального электрофореза LKB 2001 («LKB», Швеция) при силе тока 15 мА в концентрирующем и 25 мА в разделяющем геле. После электрофоретического фракционирования ПААГ отмывали от избытка ДСН в 2,5 %-м водном растворе Тритона X-100 в течение 20 минут. Далее ПААГ после отмывки от избытка ДСН накладывали на поверхность пластины 1 %-го агарозного геля толщиной 0,3 мм на стеклянной подложке (16 × 16 см), приготовленного на 0,05 М Трис-НСl буфере (рН 8,3) и содержащего 0,0125 %-й раствор СаCl<sub>2</sub> и 0,5 %-й раствор неионного детергента в качестве субстрата. Полученный «сэндвич» помещали во влажную камеру и инкубировали в термостате при 37 °С в течение суток. О наличии липолитических ферментов судили по образованию на агарозных репликах белых полос вследствие гидролиза субстрата.

Документирование и оценку полученных зимограмм проводили с использованием пакета программ Image Lab 2.01 на приборе GelDoc XR+ (Bio-Rad, США). Статистическую обработку проводили общепринятыми методами, рассчитывая среднеарифметические величины и их средние ошибки.

Таблица 1

Характеристика исследованных штаммов *Vibrio cholerae* eltor O1 и *Vibrio cholerae* O139 серогрупп

№ п/п	Название штамма	Генотип	Объект выделения
1	<i>V. cholerae</i> eltor O1 1298	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	больной
2	<i>V. cholerae</i> eltor O1 M-878	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	больной
3	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1263	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	больной
4	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1342	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	больной
5	<i>V. cholerae</i> O139 И-12	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	больной
6	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1330	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
7	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-638	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
8	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1369	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
9	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1361	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
10	<i>V. cholerae</i> eltor O1 M-800	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	больной
11	<i>V. cholerae</i> eltor O1 129-05-B	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
12	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1327	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
13	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1407	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
14	<i>V. cholerae</i> eltor O1 2-01	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
15	<i>V. cholerae</i> eltor O1 2131	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
16	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1368	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода
17	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-563	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	труп
18	<i>V. cholerae</i> eltor O1 И-1299	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вибрионоситель
19	<i>V. cholerae</i> O139 И-16	<i>ctx</i> <sup>+</sup> , <i>tcpA</i> <sup>+</sup> , <i>toxR</i> <sup>+</sup>	вода

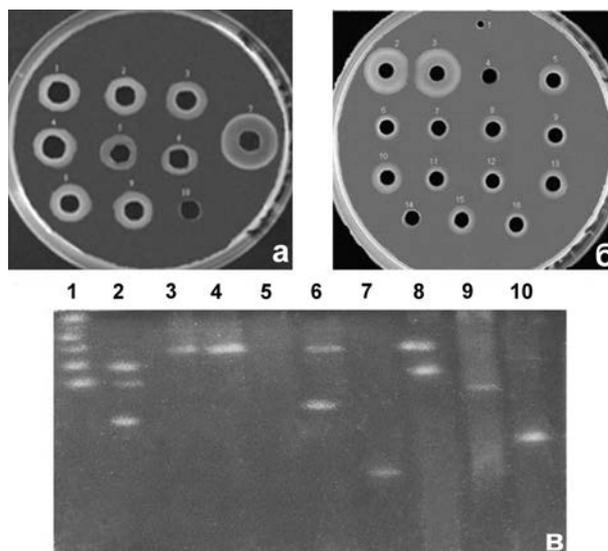
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Анализ полученных данных показал, что все субклеточные фракции (МЭ и НМ) холерного вибриона O1 и O139 серогрупп обладали в той или иной степени липолитической активностью независимо от происхождения и токсигенности конкретного штамма. Статистически значимые различия в активности отмечены во фракциях МЭ и НМ, полученных из каждого штамма (рис. 1а, б). Максимальный гидролиз в реакции энзимодиффузии в агарозном геле отмечен в отношении Твина-20, Твина-80, Тритона X-305 и Тритона X-405 соответственно ( $6,00 \pm 0,02$  мм;  $p < 0,05$ ). В целом суммарная активность гидролаз МЭ в отношении Твина-20, Твина-80, Тритона X-405, Спана-85 превосходила таковую для препаратов НМ, полученных из штаммов холерного вибриона разного происхождения, независимо от серогруппы и токсинообразования. Со средней активностью происходил гидролиз Твина-60 и Тритона X-405 субклеточными фракциями *V. cholerae* O1 серогруппы ( $3,00 \pm 0,03$  мм), а Твина-60 – препаратами O139 серогруппы ( $1,500 \pm 0,03$  мм;  $p < 0,05$ ). Тритон X-114 гидролизировался с минимальной активностью препаратами субклеточных фракций *V. cholerae* O1 серогруппы, а препараты O139 серогруппы минимально гидролизировали Тритон X-114 и Тритон X-100 (зоны гидролиза не превышали 1 мм).

Максимальную липолитическую активность в отношении твинов (Твина-20) проявили препараты МЭ, полученные из нетоксигенных штаммов O1 серогруппы ( $7,00 \pm 0,04$  мм), в то время как относительно тритонов (Тритона X-305, Тритона X-405, Тритона X-100) – препараты МЭ из токсигенных штаммов ( $8,00 \pm 0,03$  мм;  $p < 0,05$ ). Препараты МЭ *V. cholerae* O139 серогруппы с *ctx*<sup>+</sup> генотипом более активно ( $5,00 \pm 0,04$  мм;  $p < 0,05$ ) гидролизировали Твин-20, а Твин-60 гидролизировали одинаково с препаратами МЭ из штаммов O1 серогрупп (зоны гидролиза были менее 1 мм). Общая гидролитическая активность, проявляемая препаратами из клинических штаммов в отношении Твина-80, не отличалась от таковой для препаратов водных штаммов ( $5,00 \pm 0,03$  мм;  $p < 0,05$ ).

Сравнение ферментативной активности препаратов НМ показало, что в отношении твинов гидролиз более активно проявляли препараты нетоксигенных штаммов ( $2,50 \pm 0,03$  мм), тогда как в отношении тритонов активность была выше у препаратов НМ из токсигенных штаммов ( $3,00 \pm 0,02$  мм;  $p < 0,05$ ) при одинаково низких показателях активности препаратов НМ в отношении Спан-85 для обеих серогрупп и Тритона X-100 для O139 серогруппы.

При изучении липолитической активности субклеточных фракций с помощью зимографии установлено, что в неденатурирующих условиях состав липолитических ферментов МЭ в сравнении с препаратами НМ обладает большим разнообразием. У препарата МЭ *V. cholerae eltor* O1 M-878 обнаружено шесть полипептидов, обладающих липолитической активностью (рис. 1в, трек 1), препараты МЭ других штаммов содержат от двух (И-1298, O139 И-16) до трех (И-638, И-1263, И-1369) полос липолитической активности. У большинства препаратов НМ на зимограммах выявлена одна полоса липолитической активности.



**Рис. 1.** Зимографический анализ липолитических ферментов в мочевиновых экстрактах и наружных мембранах *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп: **а** – тест радиальной энзимодиффузии в 1%-м агарозном геле с Твином-20 в качестве субстрата (1 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 2131; 2 – МЭ *V. cholerae eltor* O139 И-12; 3 – МЭ *V. cholerae eltor* O139 И-16; 4 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1263; 5 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1330; 6 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-638; 7 – панкреатическая липаза (1 мг/мл); 8 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-638; 9 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1368; 10 – буфер 0,05 М Трис-НСI (pH 8,3)); **б** – тест радиальной энзимодиффузии в 1%-м агарозном геле с Тритоном X-305 в качестве субстрата (1 – буфер 0,05 М Трис-НСI (pH 8,3); 2 – панкреатическая липаза (1 мг/мл, 50 мкл); 3 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 M 878; 4 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1342; 5 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1342; 6 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-563; 7 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-563; 8 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 9 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 10 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369; 11 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1369; 12 – НМ *V. cholerae eltor* O1 2131; 13 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 2-01; 14 – НМ *V. cholerae eltor* И-1299; 15 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1299; 16 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 17 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369; 18 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369; 19 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369; 20 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369); **в** – энзимография липолитических ферментов субклеточных фракций *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в 13%-м ПААГ с Тритоном X-305 в качестве субстрата (1 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 M-878; 2 – панкреатическая липаза (1 мг/мл, 50 мкл); 3 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-638; 4 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1263; 5 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1342; 6 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1369; 7 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1369; 8 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 9 – НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 10 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 11 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 12 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 13 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 14 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 15 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 16 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 17 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 18 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 19 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298; 20 – МЭ *V. cholerae eltor* O1 И-1298).

Исключение составил лишь препарат НМ *V. cholerae eltor* O1 И-1342, у которого была обнаружена только большая диффузная зона в начале трека (рис. 1в, трек 5). Формирование таких диффузных зон можно объяснить замедленной диффузией на агарозный гель с субстратом или некоторой деградацией ферментного препарата, что отмечено и на других треках.

Полученные результаты свидетельствуют о значительной варибельности такого признака, как липолитическая активность у генотипически разных штаммов холерного вибриона в зависимости от выбранного субстрата. Более высокая способность МЭ из нетоксигенных штаммов O1 и из токсигенных МЭ O139 серогрупп к гидролизу субстратов, содержащих короткоцепочечные жирные кислоты, может быть объяснена преобладанием у них эстераз, в отличие

от препаратов МЭ, полученных из токсигенных штаммов, высокую гидролитическую активность которых в отношении субстратов с длинноцепочечными жирными кислотами можно связать с действием липаз.

Без наличия широчайшего спектра энзиматической активности холерные вибрионы не обладали бы присущей им конкурентоспособностью и возможностью адаптации к различным условиям окружающей среды. Так, для роста холерных вибрионов могут служить разнообразные природные органические соединения, имеющие в своём составе эфирные связи. Более того, в качестве единственного источника углерода вибрионы могут использовать искусственные сложные эфиры – твины и тритоны [3].

Ранее нами было показано, что способ обработки живых микробных клеток 4,5 М раствором мочевины позволяет получать стерильные препараты НМ холерного вибриона, сохраняющие протеазную и фосфолипазную активности [8]. В настоящей работе представлены результаты по изучению липолитической активности препаратов субклеточных фракций холерного вибриона в отношении синтетических соединений – неионных детергентов, используемых в качестве субстрата в тестах радиальной энзимодиффузии и постэлектрофоретического переноса в агарозные гели. Известно, что липолитическая активность – это признак, который значительно варьирует даже у представителей, относящихся к одному и тому же виду микроорганизмов [2, 6]. В ранних публикациях по твиназной активности холерных вибрионов изучение проводилось на целых клетках или компонентах химической вакцины [2]. Липолитические ферменты изучены еще далеко не достаточно, однако по некоторым свойствам возможно их сравнение. Для нас интерес представляли данные о наличии и распределении липолитической активности в субклеточных фракциях холерного вибриона (водорастворимые и мембрансвязанные). По наличию липолитических ферментов возможно провести сравнение фракций, относящихся к одному или разным штаммам, принадлежащих к одной или разным серогруппам, разного происхождения и эпидзначимости.

Кроме того, имеющиеся различия между субклеточными фракциями в липолитической активности в отношении используемых субстратов могут свидетельствовать о проявлении индивидуальных свойств взятых в эксперимент штаммов и, вероятно, связаны как с ферментным составом фракций, их удельной активностью, чувствительностью к факторам окружающей среды и возможностью отражать свойства внутриклеточного липидного обмена клетки. Разница в твиназной активности целых клеток штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы легла в основу теста дифференциации патогенных и непатогенных вибрионов этой серогруппы [2]. Однако для вибрионов O1 серогруппы корреляцию твиназной активности с такими признаками, как вирулентность, место и объект выделения, принадлежность к серовару или биовару, выявить не удалось [3].

При анализе полученных результатов необходимо учитывать штаммовые особенности, а также влияние на липолитическую активность субстратов, имеющих

разную природу (разное количество цепочек жирных кислот в составе молекулы), что наблюдается при использовании различных твинов и тритонов. Изучение активности этих ферментов в разных экспериментальных условиях в зависимости клеточной локализации и характеристики исходных штаммов-продуцентов, может быть полезно не только в аспекте основного внутриклеточного метаболизма, но и в аспекте установления степени их участия в патогенезе холеры и других инфекционных заболеваний. Данные в этой области позволят расширить характеристики штаммов холерного вибриона и дифференцировать их по этому признаку. Штаммы, проявившие высокую липолитическую активность, на дальнейших этапах могут быть использованы как продуценты этих ферментов с целью их последующего выделения и очистки для конструирования противохолерной вакцины.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в субклеточных фракциях с помощью зимографических методов обнаружены липолитические ферменты, выявлены количественные и качественные различия по степени их продукции, субстратной специфичности и активности. Таким образом, зимографические методы представляют собой удобный, наглядный и простой инструмент, пригодный для сравнительного изучения состава и свойств бактериальных гидролаз.

## ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Адамов А.К. Перспективы совершенствования холерных вакцин // Эпидемиология, эпизоотология и профилактика особо опасных инфекций. – Саратов, 1986. – С. 75–84.
2. Adamov AK (1986). Perspectives of cholera vaccine improvement [Perspektivy sovershenstvovaniya kholernykh vaktsin]. *Epidemiologiya, epizootologiya i profilaktika osobo opasnykh infektsiy*, 75-84.
3. Дуванова О.В., Шиманюк Н.Я., Мишанькин Б.Н. Способность расщеплять твин 20 как дифференциальный тест для вибрионов O139 серовара различного происхождения // Клини. лаб. диагн. – 2000. – № 5. – С. 48–49.
4. Duvanova OV, Shimanyuk NY, Mishankin BN (2000). Ability to hydrolyze Tween-20 as a differential test for vibrios of O139 serovar of different origin [Sposobnost' rasshcheplyat' tvin 20 kak differentsial'nyy test dlya vibriionov O139 serovara razlichnogo proiskhozhdeniya]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, (5), 48-49.
5. Кузьмиченко И.А., Грачёва И.В., Плотников О.П. Деструктивная активность и рост холерного вибриона в присутствии твинов // Пробл. особо опасных инф. – 2001. – Вып. 1, № 81. – С. 101–105.
6. Kuzmichenko IA, Grachyova IV, Plotnikov OP (2001). Destructive activity and growth of *Vibrio cholerae* in presence of Tweens [Destruktivnaya aktivnost' i rost kholernogo vibriona v prisutstvii tvinov]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*, 1 (81), 101-105.
7. Паканещикова Н.В., Силищев Н.Н., Галимзянова Н.Ф., Логинов О.Н. Сравнительное изучение зависимости липолитической активности бактерий рода *Serratia* от состава питательной среды // Башкирский химический журнал. – 2006. – Т. 13, № 4. – С. 31–34.

Pakaneshchikova NV, Silishchev NN, Galimzyanova NF, Loginov ON (2006). Comparative study of dependence of lipolytical activity of *Serratia* genus bacteria on the content of nutritional media [Sravnitel'noe izuchenie zavisimosti lipoliticheskoy aktivnosti bakteriy roda *Serratia* ot sostava pitatel'noy sredy]. *Bashkirskiy khimicheskiy zhurnal*, 13 (4), 31-34.

5. Способ дифференциации атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп от токсигенных по гидролазной активности: Пат. 2375457 Рос. Федерация; С1 C12Q 1/04, 1/30, C12R 1/63 / Агафонова В.В., Телесманич Н.Р., Акулова М.В.; Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. – № 2008117194; заявл. 29.04.08; опубл. 10.12.09. Бюл. № 34, 8 с.

Агафонова ВВ, Телесманич НР, Акулова МВ (2009). Method of differentiation of atoxigenic *Vibrio cholerae* strains of O1 and O139 serogroups from toxigenic strains by hydrolase activity: Patent N 2375457 of the Russian Federation [Sposob differentsiatsii atoksigennykh shtammov kholernykh vibrionov O1 i O139 serogrupp ot toksigennykh po gidrolaznoy aktivnosti: Pat. 2375457 Ros. Federatsiya: C1 C12Q 1/04, 1/30, C12R 1/63], (34), 8.

6. Способ определения липолитической активности в субклеточных фракциях бактерий: Пат. 2501014 Рос. Федерация; С1 G01N 33/50, 33/48 / Козлов С.Н., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Урбанович Л.Я., Загоскина Т.Ю., Попова Ю.О.; Иркутский научно-исследовательский противочумный институт. – № 2012132418; заявл. 15.08.12.; опубл. 10.12.13. Бюл. № 34, 8 с.

Козлов SN, Markov EY, Nikolaev VB, Urbanovich LY, Zagoskina TY, Popova YO (2013). Method for determination of lipolytical activity in subcellular fractions of bacteria [Sposob opredeleniya lipoliticheskoy aktivnosti v subkletochnykh fraktsiyakh bakteriy: Pat. 2501014 Ros. Federatsiya; S1 G01N 33/50, 33/48], (34), 8.

7. Телесманич Н.Р. Триацилглицеролипазная активность гемолитических холерных вибрионов // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2004. – № 2. – С. 11–14.

Телесманич НР (2004). Triacylglycerol lipase activity of haemolytic *Vibrio cholerae* [Triatsilglitserolipaznaya

aktivnost' gemoliticheskikh kholernykh vibrionov]. *Zh. mikrobiol., epidemiol. i immunobiol.*, (2), 11-14.

8. Урбанович Л.Я., Марков Е.Ю., Голубинский Е.П., Колесник Р.С., Саппо С.Г., Ганин В.С., Каретникова Э.С., Иванова Т.А. Характеристика иммунобиологических свойств антигенного препарата наружных мембран холерного вибриона // Биотехнология. – 1996. – № 6. – С. 27–33.

Urbanovich LY, Markov EY, Golubinsky EP, Kolesnik RS, Sappo SG, Ganin VS, Karetnikova ES, Ivanova TA (1996). Characteristic of immunobiological properties of antigenic preparation of *Vibrio cholerae* outer membranes [Kharakteristika immunobiologicheskikh svoystv antigennogo preparata naruzhnykh membran kholernogo vibriona]. *Biotehnologiya*, (6), 27-33.

9. Bornscheuer UT (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26 (1), 73-81.

10. Hosseingholi EZ (2014). In silico analysis of *Acinetobacter baumannii* phospholipase B as a subunit vaccine candidate. *Acta Biotheoretica*, 64 (4), 455-475.

11. Ingole KV, Jalgaonkar SV, Fule RP (1998). Study of proteases and other enzymes of *Vibrio cholerae* O1 Eltor and O139 serotypes isolated in Yavatmal (Maharashtra). *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 41 (4), 419-422.

12. Jensen RG (1983). Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, 18 (9), 650-657.

13. Rosenstein R, Gotz F (2000). *Staphylococcal* lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*, 82, 1005-1014.

14. Schuepp C, Kermasha S, Michalski MC, Morin A (1997). Production, partial purification and characterisation of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *Proc. Biochem.*, 32 (3), 225-232.

15. Stehr F, Kretschmar M, Kroger C, Hube B, Schaffer W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, 22 (5-6), 347-355.

16. Whayeb SA, Yamamoto K, Castillo MY (1996). Lysophospholipase L2 of *Vibrio cholerae* O1 affects cholera toxin production. *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, 15 (1), 9-15.

#### Сведения об авторах

#### Information about the authors

**Козлов Станислав Николаевич** – научный сотрудник биохимического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-38; e-mail: ejimei@mail.ru)

**Kozlov Stanislav Nikolaevich** – Research Officer of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor (664047, Irkutsk, ul. Trilissera, 78; tel.: +7 (3952) 22-01-38; e-mail: ejimei@mail.ru)

**Николаев Валерий Борисович** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора»

**Nikolaev Valeriy Borisovich** – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

**Марков Евгений Юрьевич** – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий биохимическим отделом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора»

**Markov Evgeniy Yurjevich** – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer, Head of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

**Урбанович Людмила Яковлевна** – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора»

**Urbanovich Ljudmila Yakovlevna** – Doctor of Medical Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Cholera of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor

**Миткеева Светлана Карловна** – лаборант лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора»

**Mitkeeva Svetlana Karlovna** – Laboratory Assistant of the Laboratory of Cholera of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor