

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
К.Г. Скрябин (Москва), Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

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

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Василов 4

Оригинальные статьи

Образование и компартиментализация проантоцианидинов в *in vitro* культурах чайного растения.

М.Ю. Зубова, Т.Л. Нечаева, Н.В. Загоскина 5

Оптимизация процесса выделения фикоцианина из цианобактерии *Arthrospira platensis*.

А.С. Труфанова, Н.П. Бабиченко, Я.Э. Сергеева 11

Применение биоанода на основе *Glucopobacter oxydans* из углеродной ткани в фотобиореакторе для очистки сточных вод.

М.В. Вишневецкая, Ю.М. Парунова, П.М. Готовцев, Р.Г. Василов 17

Сравнительная характеристика ферментов углеводного обмена у бактерий *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli*.

Л.К. Букуру, Е.Е. Зинурова, Т.В. Багаева 22

Сравнительная характеристика биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов для выявления возбудителя туляремии.

И.В. Жарникова, Е.В. Жданова, Т.В. Жарникова, О.Л. Старцева, С.А. Курчева,

А.С. Геогджаян, А.А. Семирчева, А.Г. Кошкидько, Ю.Ю. Гаркуша 27

Лиофилизация микробов туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ.

Д.Н. Бибииков, А.В. Комиссаров, О.А. Волох, Е.М. Кузнецова, С.А. Бадарин, Н.Г. Авдеева,

Ю.И. Самохвалова, А.К. Никифоров 32

Обзоры

Комплексный методический подход для выделения иммунобиологически активных антигенных компонентов внешних мембран туляремийного микроба.

Е.М. Кузнецова, С.В. Борисова, О.А. Волох, А.К. Никифоров 41

Использование биомассы микроводорослей для очистки стоков и получения биогаза: проблемы и перспективы.

Д.О. Карякин, Н.М. Щеголькова 50

Нематода *Caenorhabditis elegans* как биологическая модель для изучения патогенетических свойств холерного вибриона.

Г.В. Демидова 64

Современные технологии и подходы в разработке систем жизнеобеспечения обитаемых космических аппаратов. Часть 1.

Д.В. Сухинов, П.М. Готовцев, Я.Э. Сергеева, К.В. Горин, Р.Г. Василов 69

Хроника 77

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Formation and compartmentalization of proanthocyanidines in tea plant in vitro cultures.

M.Yu. Zubova, T.L. Nechaeva, N.V. Zagorskina 5

Optimization of the process of isolation of phycocyanin from cyanobacteria *Arthrospira platensis*.

A.S. Trufanova, N.P. Babichenko, Ya.E. Sergeeva 11

The use of carbon textile bioanode based on *Gluconobacter oxydans* in photobioreactor for wastewater treatment.

M.V. Vishnevskaya, Yu.M. Parunova, P.M. Gotoutsev, R.G. Vasilov 17

Comparative characterization of carbohydrate exchange enzymes in bacteria *Escherichia fergusonii* E3 and *Escherichia coli*.

L.C. Bukuru, E.E. Zinurova, T.V. Bagaeva 22

Comparative characteristics of biotechnology for the production of erythrocyte and latex diagnosticums to identify the causative agent of tularemia.

I.V. Zharnikova, E.V. Zhdanova, T.V. Zharnikova, O.L. Startseva, S.A. Kurcheva,

A.S. Geogjayan, A.A. Semircheva, A.G. Koshkidko, Yu.Yu. Garcusha 27

Lyophilization of microbes of tularemia vaccine strain 15 NIIEG.

D.N. Bibikov, A.V. Komissarov, O.A. Volokh, E.M. Kuznetsova, S.A. Badarin, N.G. Avdeeva,

Yu.I. Samokhvalova, A.K. Nikiforov 32

Reviews

An integrated methodological approach for the isolation of immunobiologically active antigenic components of the outer membranes of tularemia microbe.

Ye.M. Kuznetsova, S.V. Borisova, O.A. Volokh, A.K. Nikiforov 41

The use of microalgae biomass for wastewater treatment and biogas production: problems and prospects.

D.O. Karjakin, N.M. Schegolkova 50

Nematode *Caenorhabditis elegans* as a biological model for studying the pathogenetic properties of cholera vibrio.

G.V. Demidova 64

Modern technologies and approaches in the life support systems development for inhabited spacecraft. Part 1.

D.V. Sukhinov, P.M. Gotoutsev, Ya.E. Sergeeva, K.V. Gorin, R.G. Vasilov 69

The chronicle 77

Rules for authors 78

К читателям

Четвертый номер журнала за 2019 год традиционно содержит блок оригинальных статей и обзоров. В разделе оригинальных работ помещена статья Зубовой М.Ю., Нечаевой Т.Л., Загоскиной Н.В. (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН), в которой изложены результаты изучения образования и компартиментализации представителей вторичного метаболизма растений — проантоцианидинов — в каллусных культурах чайного растения *Camellia sinensis* (L.) Kuntze.

Далее идут экспериментальные статьи из НИЦ «Курчатовский институт». В работе Труфановой А.С., Бабиченко Н.П., Сергеевой Я.Э. осуществлена оптимизация выделения фикоцианина из биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis*. Вишнева М.В. с коллегами создан новый микробный топливный элемент с использованием *Gluconobacter oxydans*, который после дальнейших усовершенствований может послужить для очистки городских сточных вод.

Группа казанских специалистов под руководством профессора Багаевой Т.В. выполнила исследование «Сравнительная характеристика ферментов углеводного обмена у бактерий *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli*». Наибольшая активность была обнаружена у бета-галактозидазы *Escherichia fergusonii* E3 в клеточных экстрактах.

Большой авторский коллектив из Ставропольского противочумного института (Жарникова И.В. и др.) представил итоги сравнительного анализа биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов для выявления возбудителя туляремии на основе проведения соответствующих реакций.

Бибиков Д.Н. и др. (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова) экспериментально обосновали возможность производства новой формы туляремийной вакцины — лиофилизата во флаконах. Ими разработан новый состав среды высушивания туляремийного микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Определены оптимальные параметры лиофилизации и исследованы спецификационные характеристики вакцины.

Публикуется ряд актуальных обзоров. Так, Карякин Д.О., Щеголькова Н.М. (Институт водных проблем РАН, Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова) обсудили проблемы использования биомассы микроводорослей для очистки стоков и получения биогаза. Демидова Г.В. (Ростовский-на-Дону противочумный институт) проанализировала возможности нематоды *Caenorhabditis elegans* как биологической модели для изучения патогенетических свойств холерного вибриона. Кузнецова Е.М. с соавторами из Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» с использованием литературного и собственного материала дали обзор комплексного методического подхода для выделения иммунобиологически активных антигенных компонентов внешних мембран туляремийного микроба.

Сушинов Д.В. с соавт. (НИЦ «Курчатовский институт», МФТИ) представили первую часть своего обзора, посвященного рассмотрению современных технологий и подходов в разработке систем жизнеобеспечения обитаемых космических аппаратов.

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

ОБРАЗОВАНИЕ И КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ В *IN VITRO* КУЛЬТУРАХ ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ

М.Ю. ЗУБОВА*, Т.Л. НЕЧАЕВА, Н.В. ЗАГОСКИНА

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

Впервые изучены накопление и компартментализация таких представителей вторичного метаболизма растений, как проантоцианидины, в каллусных культурах чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), выращиваемых в темноте и перенесенных в световые условия. Показаны отличия в содержании и распределении растворимых и нерастворимых их форм у гетеротрофной культуры и культуры, выращиваемой на свету. В условиях освещения рост каллусных культур чая замедлялся, а количество проантоцианидинов снижалось, что не отмечалось при их выращивании в темноте.

Ключевые слова: чайное растение, *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, каллусные культуры, проантоцианидины, компартментализация, влияние света.

Введение

Высшие растения обладают способностью к образованию различных вторичных метаболитов, в том числе наиболее распространенных их представителей — фенольных соединений или полифенолов [7]. К их числу относятся проантоцианидины, являющиеся производными флаван-3-олов и представленные как олигомерными, так и полимерными формами [14]. Накопление этих веществ характерно преимущественно для древесных и кустарниковых растений, где они обнаружены в плодах, семенах, коре, стеблях, листьях, а также корнях [18].

В последнее десятилетие проантоцианидины вызывают большой интерес у исследователей. Установлено их участие в защите растений от действия различных биотических и абиотических факторов: бактериальных и грибковых патогенов, насекомых-вредителей, УФ-Б радиации и др. [15, 17]. Кроме того, проантоцианидины могут участвовать в формировании клеточной стенки растений, прочно связываясь с ней [18].

Проантоцианидины проявляют биологическую активность и при поступлении в организм человека в составе растительных продуктов или в качестве биодобавок, о чем сообщалось в литературе [15, 17, 18]. Отмечалось их участие в защите клеток от действия активных форм

кислорода, проявлении противоопухолевой, антибактериальной, антимутагенной, иммуномодулирующей и капилляр-укрепляющей активности [13].

Использование *in vitro* культур клеток и тканей является одним из актуальных подходов как при изучении, так и при получении биологически активных веществ растительного происхождения, к которым относятся различные вторичные метаболиты [19]. Их преимуществами, по сравнению с интактными растениями, служит более простой уровень внутритканевой и внутриклеточной организации, рост в строго контролируемых условиях, а также сохранение специфики метаболизма исходных тканей [1, 16].

Известно, что растения чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) обладают специализированным обменом, направленным на биосинтез различных полифенолов, в том числе и проантоцианидинов, и эта особенность сохраняется при их выращивании в условиях *in vitro* [8, 22]. Одним из факторов, активизирующих их накопление в культурах чая, является свет [3]. Однако вопросы образования проантоцианидинов при этом не рассматривались.

Целью нашей работы стало изучение особенностей образования и компартментализации проантоцианидинов в каллусных культурах чайного растения, выращиваемых в темноте и перенесенных в световые условия.

Материалы и методы

В работе использовали каллусные культуры, инициированные из стеблей молодых побегов чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). Культуры

выращивали в темноте при температуре 26 °С и относительной влажности воздуха 70% на модифицированной питательной среде Хеллера, содержащей 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (5 мг/л) и глюкозу (25 г/л). При проведении исследований часть каллусов переносили в условия 16-часового фотопериода (интенсивность освещения 5000 люкс). Длительность пассажа составляла 42 дня. При проведении опытов период роста культур был продлен до 54 дней.

В течение всего периода выращивания отбор каллусов проводили на различных этапах роста, определяя прирост биомассы и ее оводненность, а также содержание растворимых и нерастворимых форм проантоцианидинов.

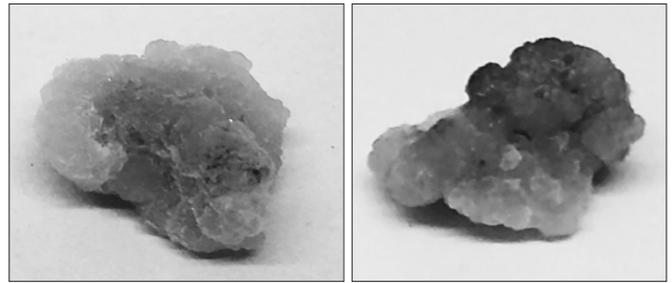
Рост культур оценивали стандартным методом, измеряя прирост биомассы каллусов за определенный период культивирования [12]. Содержание воды определяли после высушивания каллусов до постоянного веса при 70 °С.

Проантоцианидины извлекали из растительного материала 96%-ным этанолом в течение 40 мин при 45 °С. Гомогенат центрифугировали (16000 об/мин, 10 мин) и надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического определения растворимых проантоцианидинов с бутанольным реактивом (поглощение при 550 нм) [6]. Осадок, оставшийся после отделения надосадочной жидкости, несколько раз промывали 96%-ным раствором этанола, после чего обрабатывали бутанольным реактивом для определения содержания нерастворимых (связанных) форм проантоцианидинов [20]. Содержание проантоцианидинов выражали в условных единицах (усл. ед./г сухой массы), исходя из показаний E550.

Опыты проводили в двух аналитических и трех-пяти биологических повторностях. Результаты экспериментов статистически обрабатывали с использованием программ SigmaPlot 12.3. и Excel. В таблицах и на графиках представлены средние арифметические значения определений и их стандартные ошибки. Надстрочные символы обозначают достоверность различий средних значений по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,050$.

Результаты и обсуждение

Гетеротрофная каллусная культура стебля чайного растения представляла собой медленно растущий плотный каллус светло-бежевого цвета (рис. 1А). К концу пассажа она приобретала более темный цвет, что, вероятно, является следствием ее старения (рис. 1Б).

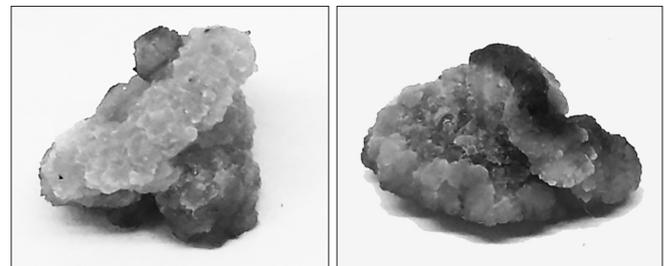


А

Б

Рис. 1. Внешний вид гетеротрофной каллусной ткани стебля чайного растения (А и Б — начало и конец цикла культивирования, соответственно)

Перенесение культуры в условия 16-часового фотопериода приводило к изменениям ее морфобиологических характеристик. К 27-му дню выращивания каллусы приобретали слабое желто-зеленое окрашивание, обусловленное формированием на их поверхности клеток, имеющих зеленоватый цвет (рис. 2А). К 40-му дню роста они имели более выраженное зеленое окрашивание (рис. 2Б). Эти изменения свидетельствуют о формировании в клетках каллусов чая хлоропластов, что происходило достаточно быстро (уже после 20-дневного воздействия света). Следовательно, для клеток чая, выращиваемых в условиях *in vitro*, характерен быстрый процесс деэтиоляции, как и для интактных растений [2].



А

Б

Рис. 2. Внешний вид каллусной ткани стебля чайного растения, выращиваемой в условиях 16-часового фотопериода (А и Б — начало и конец цикла культивирования, соответственно)

Следующей нашей задачей было изучение динамики роста каллусных тканей чайного растения, выращиваемых в темноте и перенесенных в световые условия (рис. 3). Для гетеротрофных каллусов характерен линейный рост до 47-го дня культивирования (рис. 3А). К концу этого периода прирост биомассы достигал 308%, а затем резко снижался (до 250%), что характерно для фазы гибели клеток.

Перенесение гетеротрофной каллусной культуры чая в световые условия приводило к изменениям ее роста,

которое проявлялось лишь после 33-го дня культивирования (рис. 3Б). На начальном этапе выращивания прирост биомассы у обеих культур был одинаков. В дальнейшем (33–40-й дни выращивания) у каллусов, растущих в световых условиях, он снижался, затем вновь возобновлялся, а после 47-го дня культура переходила к стационарной фазе роста. Все эти изменения могут быть следствием наличия в каллусах чая клеток с различным уровнем плоидности [4, 10]. Следует также отметить

более низкий прирост биомассы в конце пассажа у культуры, выращиваемой на свету, который был на 30% ниже по сравнению с гетеротрофным каллусом.

Еще одним важным аспектом при оценке морфофизиологического состояния каллусных культур растений является определение в них содержания воды [12]. В каллусах чая оно составляло 88–92% и зависело от фазы роста и условий выращивания культуры (табл. 1).

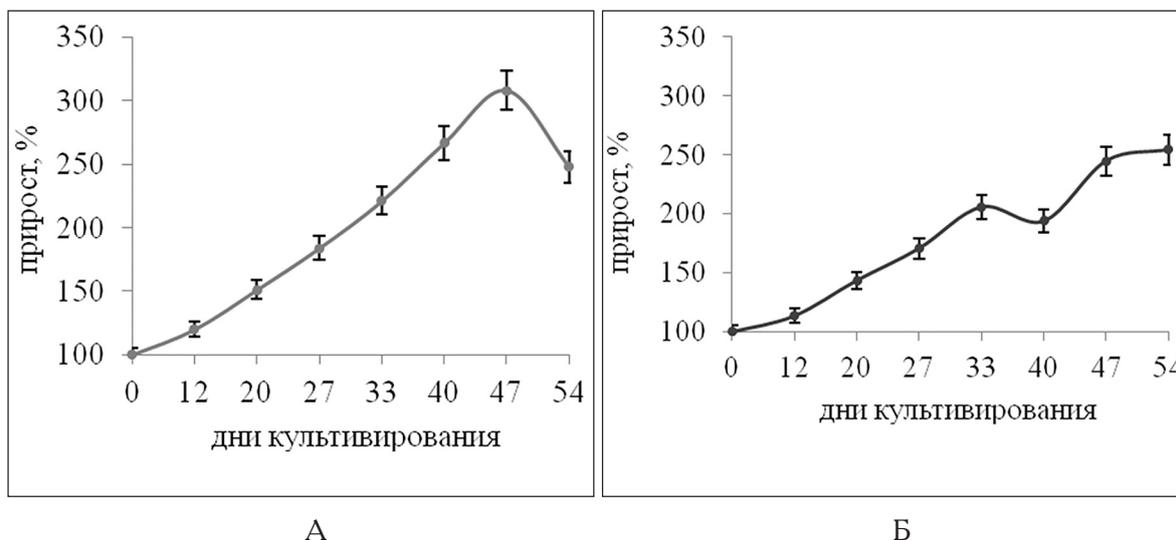


Рис. 3. Динамика роста гетеротрофной каллусной культуры стебля чайного растения (А) и культуры, перенесенной в условия освещения (Б)

Таблица 1

Изменения содержания воды по мере роста каллусной культуры стебля чайного растения в темноте и после перенесения в световые условия (16-часовой фотопериод)

Условия выращивания \ Дни роста	12	20	27	33	40	47	54
Темнота	90,62±0,41 ^a	90,79±0,48 ^a	90,60±0,22 ^a	92,93±0,71 ^b	92,00±0,05 ^b	92,60±0,66 ^b	91,57±0,28 ^a
Свет	90,66±0,06 ^a	89,83±0,49 ^a	91,70±0,37 ^a	90,99±0,80 ^a	89,51±0,05 ^a	89,44±0,37 ^a	88,03±2,73 ^a

Примечание: содержание воды в культурах выражено в % по сырой массе. Надстрочные латинские буквы обозначают достоверность различий средних значений при $p \leq 0,05$

Оводненность гетеротрофных каллусов чая незначительно изменялась в течение пассажа. При этом в первой его половине она была ниже, чем во второй, что свидетельствует о повышении степени вакуолизации клеток по мере их роста [5]. В конце пассажа оводненность каллусов снижалась, что совпадало с резким уменьшением ее биомассы, возможно, периодом деградации клеток. У культуры содержание воды в клетках было ниже, чем у гетеротрофной, что коррелирует с данными по ее биомассе (см. рис. 2).

Все вышеизложенное позволяет заключить, что каллусные культуры стебля чайного растения, выращиваемые в темноте или перенесенные в световые условия, отличались по морфофизиологическим характеристикам, характеру роста и оводненности клеток.

Как уже отмечалось выше, проантоцианидины, представляющие собой олигомерные и полимерные формы флаван-3-олов, можно отнести к главным компонентам фенольного комплекса чайного растения и инициированных из них каллусных культур [8, 22]. Эти соединения могут

быть представлены как свободными (растворимыми), так и связанными, преимущественно, с клеточными стенками (нерастворимыми) соединениями [17, 20].

Как следует из полученных данных, в гетеротрофной каллусной культуре чая характер накопления как растворимых проантоцианидинов, которые извлекаются из растительных тканей этанолом, так и нерастворимых их форм (связанных с клеточными стенками) был схож (рис. 4). При этом содержание нерастворимых проантоциани-

динов было выше, нежели растворимых. В случае интактных растений тенденция обычно противоположна [20]. Следовательно, способность гетеротрофной каллусной ткани чая накапливать большие количества связанных форм проантоцианидинов является ее особенностью и свидетельствует об активации метаболизма этих соединений в условиях *in vitro*, а также предпочтительной их компартиментализации в клеточных стенках и, возможно, мембранных структурах [14, 17, 18].

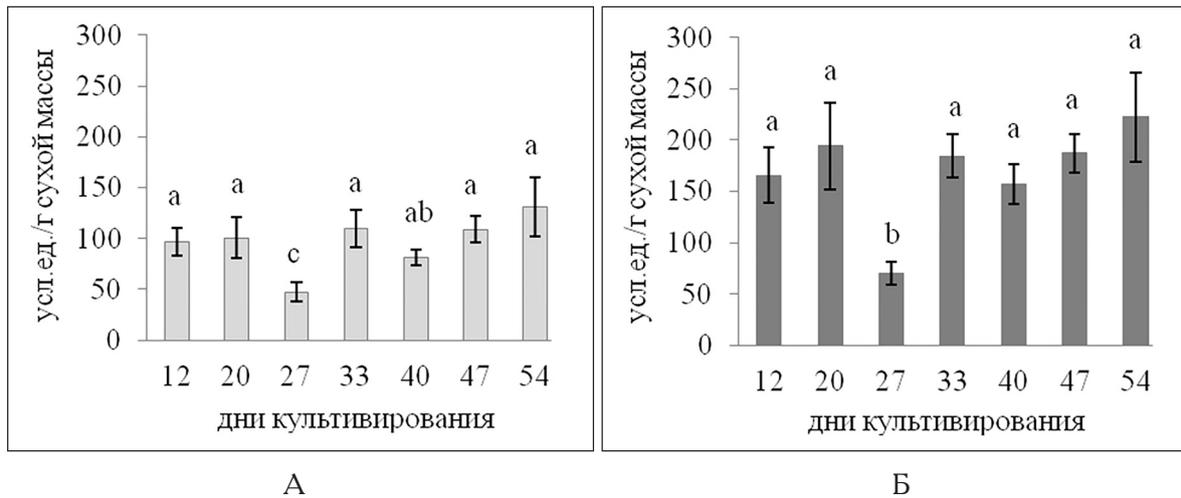


Рис. 4. Изменения в содержании растворимых (А) и нерастворимых (Б) проантоцианидинов в процессе роста гетеротрофной каллусной культуры стебля чайного растения. *Примечание:* достоверные различия средних значений при $p \leq 0,05$ отмечены разными латинскими буквами над барами

Изучение накопления различных форм проантоцианидинов в каллусе чая, выращиваемом в темновых условиях, показало сходные тенденции в отношении их образования в течение пассажа. В большинстве случаев их уровень был практически равным и составлял для растворимых проантоцианидинов в среднем 100 усл. ед./г сухой массы, а для нерастворимых — 170 усл. ед./г сухой массы. Исключением были лишь культуры 27- и 40-дневного возраста, у которых содержание растворимых проантоцианидинов было ниже на 50 и 30%, соответственно, а содержание нерастворимых — на 60 и 15%. Аналогичная тенденция к резкому снижению суммарного содержания фенольных соединений и флаванов в каллусах чая в середине пассажа отмечалась и для этой культуры и ранее [данные не опубликованы]. Возможно, эти изменения в содержании проантоцианидинов в гетеротрофном каллусе чая могут являться следствием гетерогенности его клеток по уровню пloidности, что присуще *in vitro* культурам растений [11]. Кроме того, в целом нет четкой взаимосвязи между ростом гетеротрофной культуры чая и ее способностью к накоплению этих представителей полифенолов, которые синтези-

руются на завершающих этапах биогенеза фенольных соединений [14]. Именно этим, вероятно, и объясняется «стабильность» накопления проантоцианидинов, в том числе в нерастворимой (связанной) форме, в культуре чайного растения, выращиваемой в темноте, что имеет важное значение для укрепления клеточных стенок (вместо или вместе с лигнином), о чем сообщалось в литературе [15, 18].

Перенесение гетеротрофной культуры чая в световые условия выращивания способствовало изменениям в накоплении проантоцианидинов, которое было практически равным для растворимых и связанных форм и в среднем составляло 100 усл. ед./г сухой массы (рис. 5). Несмотря на эту особенность световой культуры, динамика их образования была схожей с таковой культуры, выращиваемой в темноте.

На начальных этапах роста каллусов чая на свету (до 20-го дня) содержание этих двух форм проантоцианидинов сохранялось на уровне культуры, растущей в темноте. В течение всего последующего периода культивирования оно постепенно снижалось и к концу пассажа уменьшалось почти на 30% (см. рис. 5).

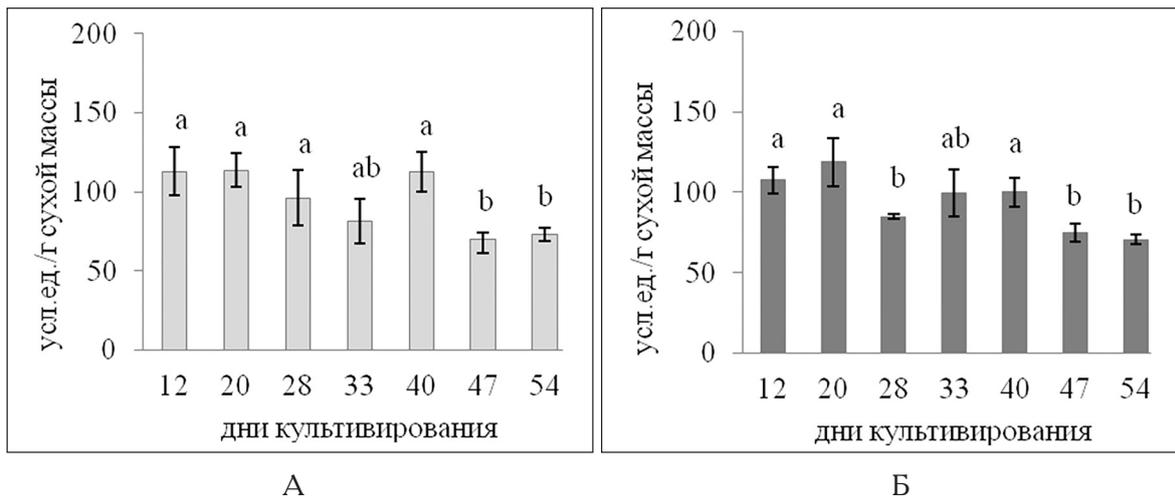


Рис. 5. Изменения в содержании растворимых (А) и нерастворимых (Б) проантоцианидинов в процессе роста каллусной культуры стебля чайного растения, перенесенной в условия освещения (16-часовой фотопериод). *Примечание:* достоверные различия средних значений при $p \leq 0,05$ отмечены разными латинскими буквами над баррами

Исключение составляло лишь содержание растворимых проантоцианидинов (см. рис. 5А), которое на 40-й день роста каллусов на свету резко увеличивалось, а затем (47-й день) вновь снижалось, что согласуется с данными по ростовой активности (см. рис. 3Б). Сопоставляя эти параметры, можно предположить, что при снижении прироста биомассы у 40-дневных культур чая, выращиваемых на свету, накопление в них растворимых проантоцианидинов увеличивалось, тогда как при повышении (47-й день) — уменьшалось. О подавлении фенольными соединениями ростовых процессов у растительных тканей сообщалось в литературе [9].

Заключение

Все вышеизложенное позволяет заключить, что в каллусных культурах чайного растения проантоцианидины присутствуют как в свободном (растворимом), так и в связанном (нерастворимом) виде. Причем, у гетеротрофных каллусов, выращиваемых в темновых условиях, связанные формы проантоцианидинов преобладали над свободными, что, возможно, свидетельствует об их важном «вкладе» в формирование и укрепление клеточных стенок [14, 15, 18]. Перенесение культур чайного растения в световые условия выращивания (16-часовой фотопериод) приводило к изменениям их морфофизиологических характеристик, формированию хлоропластов, снижению интенсивности роста и образования проантоцианидинов, что в большей степени проявлялось на уровне нерастворимых их форм, локализованных преимущественно в клеточных стенках каллусов. Все

это свидетельствует о важной роли света в регуляции биосинтеза и компартиментализации проантоцианидинов в каллусной культуре чайного растения.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. — М.: ФБК-Пресс, 1999. — 160 с.
2. Дорошенко А.С., Данилова М.Н., Медведева А.С., Кузнецов В.В. Участие компонентов сигналинга синего света в регуляции цитокинин-зависимого зеленения проростков *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. — 2019. — Т. 66. — № 6. — С. 403–411.
3. Загоскина Н.В., Дубравина Г.А., Запрометов М.Н. Особенности формирования хлоропластов и накопления фенольных соединений в фотомиксотрофных каллусных культурах чайного растения // Физиология растений. — 2000. — Т. 47. — № 4. — С. 537–543.
4. Загоскина Н.В., Федосеева В.Г., Фролова Л.В., Азаренкова Н.Д., Запрометов М.Н. Культура ткани чайного растения: дифференциация, уровень плоидности, образование фенольных соединений // Физиология растений. — 1994. — Т. 41. — № 5. — С. 762.
5. Запрометов М.Н., Загоскина Н.В., Стрекова В.Ю., Морозова Г.А. Образование фенольных соединений и процесс дифференциации в каллусной культуре чайного растения // Физиология растений. — 1979. — Т. 26. — С. 485–491.
6. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. — М.: Высшая школа, 1974. — 214 с.
7. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. — М.: Наука, 1993. — 272 с.

8. Зубова М.Ю., Загоскина Н.В. Фенольные соединения в растениях чая *Camellia sinensis* L. и полученных из них клеточных культурах // Естественные и технические науки. — 2019. — № 7. — С. 34–36.
9. Коношина С.Н., Прудникова Е.Г. Влияние полифенольных соединений на рост и развитие растений озимой пшеницы // Вестник аграрной науки. — 2015. — Т. 56. — № 5. — С. 61–67.
10. Кунах В.А., Можилевская Л.П., Адонин В.И., Губарь С.И. Продуктивность и генетическая структура популяции клеток *Panax ginseng* С.А. Меу при культивировании in vitro // Биотехнология. — 2003. — № 3. — С. 25–35.
11. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования in vitro // Физиология растений. — 1999. — Т. 46. — № 6. — С. 919–929.
12. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растения / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. — М.: БИНОМ, 2011. — С. 386–402.
13. Bladé C., Aragonès G., Arola-Arnal A., Muguerza B., Bravo F.I., Salvadó M.J., Suárez M. Proanthocyanidins in health and disease // Biofactors. — 2016. — Vol. 42. — No. 1. — P. 5–12.
14. Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B. Proanthocyanidins — a final frontier in flavonoid research? // New Phytologist. — 2005. — Vol. 165. — No. 1. — P. 9–28.
15. Ebrahimnejad H., Burkholz T., Jacob C. Flavanols and proanthocyanidins // Recent advances in redox active plant and microbial products / Eds. Jacob C., Gilbert K., Slusarenko A., Winyard P.G., Burkholz T. — Springer, Dordrecht, 2014. — P. 211–232.
16. Espinosa-Leal C.A., Puente-Garza C.A., García-Lara S. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds // Planta. — 2018. — Vol. 248. — No. 1. — P. 1–18.
17. Min B., Gu L., McClung A.M., Bergman C.J., Chen M.H. Free and bound total phenolic concentrations, antioxidant capacities, and profiles of proanthocyanidins and anthocyanins in whole grain rice (*Oryza sativa* L.) of different bran colours // Food Chemistry. — 2012. — Vol. 133. — No. 3. — P. 715–722.
18. Mouradov A., Spangenberg G. Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate // Frontiers in Plant Science. — 2014. — Vol. 5. — P. 620. doi: 10.3389/fpls.2014.00620.
19. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2012. — Vol. 48. — No. 7. — P. 609–624.
20. Ossipova S., Ossipov V., Haukioja E., Loponen J., Pihlaja K. Proanthocyanidins of mountain birch leaves: quantification and properties // Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques. — 2001. — Vol. 12. — No. 2. — P. 128–133.
21. Rauf A., Imran M., Abu-Izneid T., Patel S., Pan X., Naz S., Suleria H.A.R. Proanthocyanidins: A comprehensive review // Biomedicine and Pharmacotherapy. — 2019. — Vol. 116. — P. 1–23.
22. Sutini S., Purwanto D.A. Growth and accumulation of flavan-3-ol in *Camellia sinensis* through callus culture and suspension culture method // Journal of Biological Researches. — 2016. — Vol. 22. — No. 1. — P. 27–31.

FORMATION AND COMPARTMENTALIZATION OF PROANTHOCYANIDINES IN TEA PLANT IN VITRO CULTURES

M.Yu. ZUBOVA, T.L. NECHAEVA, N.V. ZAGOSKINA

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow

For the first time, the accumulation and compartmentalization of such representatives of plants secondary metabolism as proanthocyanidins in tea plant callus cultures (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), grown in the dark and transferred to the light conditions, were studied. Differences in the content and distribution of their soluble and insoluble forms are shown for a heterotrophic culture and a culture grown in the light. Under lighting conditions, the growth of tea callus cultures slowed down, and the number of proanthocyanidins decreased, which was not observed for the grown in the dark culture.

Keywords: tea plant, *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, callus cultures, proanthocyanidins, compartmentalization, light influence.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ ФИКОЦИАНИНА ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

А.С. ТРУФАНОВА, Н.П. БАБИЧЕНКО, Я.Э. СЕРГЕЕВА*

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

В результате исследования проведена оптимизация выделения фикоцианина из биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* при рассмотрении таких факторов, как: концентрация биомассы (соотношение биомасса-экстрагент), температура проведения экстракции, способ предварительной обработки биомассы, что привело к увеличению выхода фикоцианина с 144,8 мг/г (чистота 0,86) до 208,8 мг/г (чистота 1,07) в случае свежесобранной биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619.

Ключевые слова: фикоцианин, *Arthrospira platensis*.

Введение

Для захвата энергии света в клетках растений и водорослей присутствуют хлорофиллы *a* и *b*, что позволяет этим организмам быть фотосинтетически активными в диапазоне длин волн 400–700 нм. Цианобактерии и красные водоросли ввиду наличия только хлорофилла *a* поглощают свет, главным образом, в синей и красной области видимого спектра. Для компенсации и оптимизации сбора световой энергии в тилакоидной мембране данных организмов собираются супрамолекулярные комплексы, известные как фикобилисомы, ответственные за поглощение в диапазоне 500–660 нм [12, 22]. Каждая фикобилисома состоит из окрашенных белков, называемых фикобилипротеинами. Эти молекулы расположены в форме антенны таким образом, что поглощенная энергия направляется в реакционный центр фотосистемы II с эффективностью более 95%. В результате цианобактерии и красные водоросли могут использовать красный, желтый, зеленый и, в меньшей степени, синий свет [22]. Фикобилипротеины считаются дополнительными пигментами хлорофилла.

В зависимости от цвета, который определяется хромофором, фикобилипротеины разделены на три класса: аллофикоцианин (зелено-голубого цвета, $\lambda_{\max} \approx 650$ нм), фикоцианин (синего цвета, $\lambda_{\max} \approx 620$ нм), фикоэритрин (красного цвета, $\lambda_{\max} \approx 565$ нм).

Наиболее широко используемым фикобилипротеином является фикоцианин (ФЦ). Возможность применения ФЦ диктуется его чистотой, которая определяется соотношением максимумов поглощения при 620 и 280 нм. Считается, что чистота пищевого фикоцианина не превышает 0,7, для фикоцианина градации «реагент» величина данного показателя составляет от 0,7 до 3,9, более 4 — аналитический фикоцианин. От чистоты зависит и его рыночная цена, например, пищевой фикоцианин оценивается примерно в 0,13 долл. США за миллиграмм, в то время как стоимость реагента или аналитического фикоцианина сорт может составлять до 15 долл. США за миллиграмм [7].

Изначально обладая насыщенным, ярким цветом, фикоцианин рассматривался в качестве альтернативы синтетическим красителям в пищевой и косметической промышленности. Доказано [14, 19], что фикоцианин не токсичен и на данный момент он официально разрешен к применению в пищевой промышленности.

Особые свойства ФЦ показали возможность его применения в различных областях, в том числе в качестве флуоресцентного зонда для иммунодиагностики и перспективного терапевтического агента при окислительном стрессе [6, 13, 15, 17, 18, 20, 25]. Применение ФЦ в медицине обусловлено его противовоспалительными, противовирусными, противораковыми, иммуностимулирующими и антиоксидантными свойствами [5, 10, 21].

Согласно литературным данным, природными источниками ФЦ являются различные виды цианобактерий, такие как: *Synechococcus* sp., *Limnathrix* sp., *Synechocystis aquatilis*, *Phormidium fragile*, *Arthonema africanum*, *Aphanizomenon flosaquae*,

© 2019 г. Труфанова А.С., Бабиченко Н.П., Сергеева Я.Э.

* **Автор для переписки:**

Сергеева Яна Эдуардовна

к.х.н., ст.н.с., НИЦ «Курчатовский институт», отдел биотехнологии и биоэнергетики

e-mail: Sergeeva_YE@nrcki.ru

Phormidium sp., *Calothrix* sp., *Spirulina fusiformis*, *Spirulina maxima*, *Spirulina platensis* и *Arthrospira platensis* [11]. При этом содержание ФЦ может отличаться в зависимости от вида цианобактерий и условий культивирования биомассы. В настоящее время активно проводятся дополнительные исследования, направленные на увеличение содержания ФЦ в биомассе цианобактерий, путем изменения различных параметров условий культивирования биомассы [16]. По данным литературы, цианобактерия *Arthrospira platensis* является основным источником ФЦ, содержание которого составляет 39,2–67,8 мг/г, а чистота может достигать 6,69 [11].

В общем случае процесс получения ФЦ из биомассы *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) можно разделить на два этапа:

1. Непосредственно процесс выделения — экстракции из биомассы (сухой или влажной) с использованием различных экстрагентов и способов предварительной обработки биомассы (замораживание/оттаивание, микроволновая и ультразвуковая экстракция и др.). Конечным продуктом этой стадии является так называемый сырой экстракт ФЦ, чистота которого, как правило, не превышает 1.

2. Стадия дополнительной очистки сырого экстракта для получения ФЦ желаемой чистоты различными методами, в том числе: осаждение сульфатом аммония, хроматография, диализ и др.

Следует отметить, что на эффективность выделения ФЦ влияют различные факторы, включая метод разрушения клеток, тип экстрагента, концентрацию биомассы и время экстракции [1, 23]. Основная проблема экстракции ФЦ обусловлена наличием многослойной клеточной стенки и большого количества загрязняющих веществ [20].

Целью настоящей работы является оптимизация условий выделения ФЦ как из свежесобранной биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619, так и из коммерческой сухой биомассы «Спирулина-Сочи НЦ-ВК».

Материалы и методы

Объекты исследования: свежесобранная биомасса цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619 (ВКПМ) и коммерческая сухая биомасса «Спирулина-Сочи НЦ-ВК» (ООО «Агро-Виктория», Россия).

Условия выделения фикоцианина: температура проведения экстракции (4 ± 1 °С, 25 ± 1 °С), способ

предварительной обработки биомассы (без обработки, трехкратный цикл замораживания/оттаивания, ультразвуковая на УЗ-ванне («Сапфир» 2,8 л (220 Вт, 50 кГц, Россия) или УЗ-гомогенизаторе (Hielscher UIP500 D (500 Вт, 20 кГц, Германия)) и количество биомассы (мг/мл) указаны для каждого варианта опыта. В качестве экстрагента использовали натрий-фосфатный буфер (рН 7,0). Обработку биомассы ультразвуком проводили при охлаждении, режим озвучивания: УЗ-гомогенизатора периодический (20 с озвучивание, 10 секунд пауза), УЗ-ванны — постоянный.

Количественное определение фикоцианина. При оценке эффективности используемых методов экстракции ФЦ сравнивали показатели его выхода (мг/г асб) и чистоты. Спектры поглощения растворов фикоцианина снимали на спектрофотометре Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis (США).

Содержание и чистоту С-РС рассчитывали по формулам:

$$C - PC \left(\frac{\text{мг}}{\text{мл}} \right) = \frac{A_{620} - 0,474 \times A_{650}}{5,34} [2],$$

$$C - PC \left(\frac{\text{мг}}{\text{г}} \right) = \frac{C - PC \left(\frac{\text{мг}}{\text{мл}} \right) \times V_{\rho-\rho_0} (\text{мл})}{m_{\text{навески}} (г)}$$

$$\text{Чистота } C - PC = \frac{A_{620}}{A_{280}} [3],$$

где A_{λ} — оптическая плотность при λ нм.

Результаты и обсуждение

Влияние температуры проведения экстракции на выход и чистоту ФЦ. В большинстве из опубликованных исследований для экстракции ФЦ используется фосфатный буфер (рН 7,0) и процесс исчерпывающей экстракции проводят либо при комнатной температуре (25 °С), либо при 4 °С. Поэтому на первом этапе исследований рассмотрели влияние температуры на выход и чистоту ФЦ при концентрации нативной биомассы 1,5 мг/мл. Полученные результаты представлены на рисунке 1. Из приведенного рисунка видно, что при выделении ФЦ из свежесобранной биомассы *A. platensis* В-12619 выход (178,5 мг/г при 4 °С и 144,8 мг/г при 25 °С) и чистота (0,96 и 0,84 соответственно) выше при проведении процесса экстракции при 4 °С. В случае использования в качестве исходного сырья коммерческой биомассы выход ФЦ несколько выше (112,4 и 104,3 мг/г) при проведении процесса при комнатной температуре, однако при этом показатель чистоты несколько снижается.

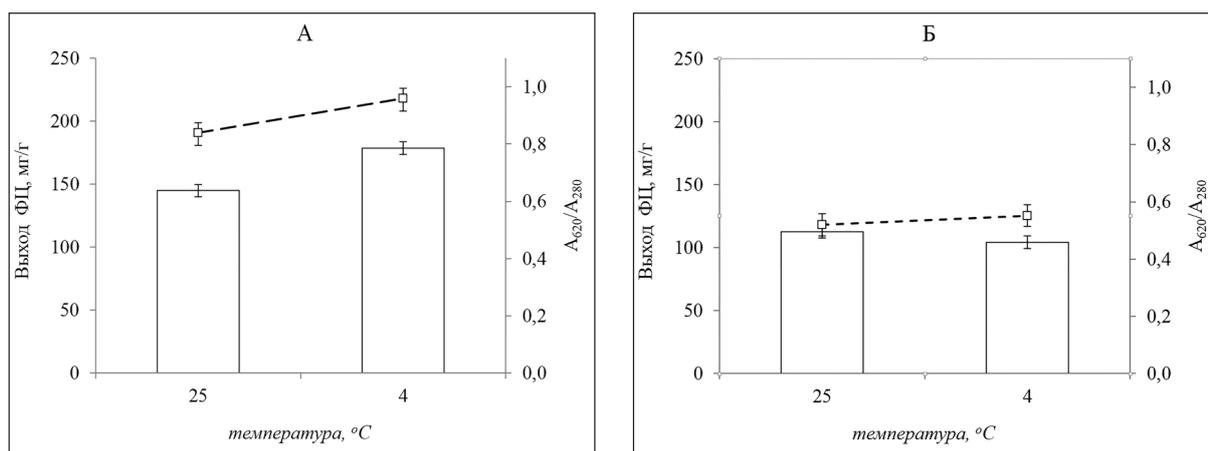


Рис. 1. Влияние температуры проведения экстракции на выход и чистоту фикоцианина: А – *Arthrospira platensis* В-12619; Б – Спирулина-Сочи НЦ-ВК

Таким образом, при проведении дальнейших исследований для достижения оптимального соотношения выход/чистота процесс экстракции ФЦ проводили при 4 °С.

Влияние концентрации биомассы (мг/мл) на выход и чистоту С-фикоцианина. Как упоминалось ранее, одним из факторов, влияющих на степень извлечения ФЦ, является соотношение биомасса — объем экс-

трагента или концентрация биомассы (мг/мл). Поэтому на следующем этапе исследований было рассмотрено влияние концентрации биомассы на выход и чистоту ФЦ. Полученные результаты представлены на рисунке 2. Как видно из приведенных результатов, диапазон оптимальных концентраций для получения наилучшего соотношения выход/чистота ФЦ независимо от типа исходного сырья составил от 1 до 10 мг/мл.

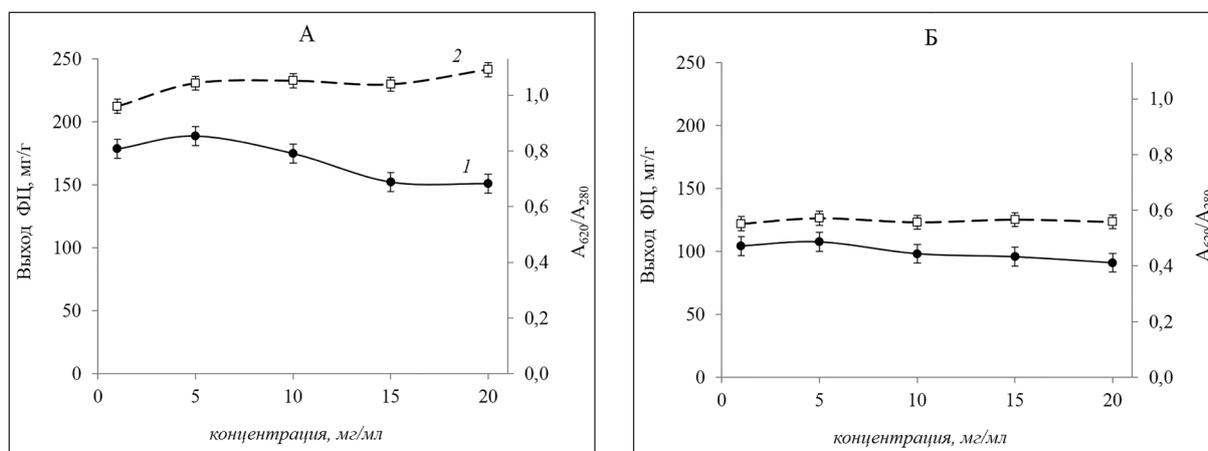


Рис. 2. Влияние концентрации биомассы на выход и чистоту фикоцианина: А – *A. platensis* В-12619; Б – Спирулина НЦ-ВК

Таким образом, концентрация биомассы при дальнейших исследованиях составляла 5 мг/мл.

Влияние метода предварительной обработки биомассы *A. platensis* на выход и чистоту С-фикоцианина. На полноту извлечения ФЦ влияет способ предварительной обработки биомассы. Так, в ряде работ [например, 4, 8] показано, что 3-кратный цикл замораживания/оттаивания (-20 °С/25 °С) нарушает целостность клеточной стенки *A. platensis*, что приводит к повышению выхода ФЦ. Кроме того, одним из широко используемых способов разрушения клеток является обработка ультразвуком [24].

На следующем этапе работы исследовали влияние способа предварительной обработки биомассы: путем 3-кратного цикла замораживания/оттаивания и воздействием ультразвука (ультразвуковая ванна или ультразвуковой гомогенизатор) на выход и чистоту ФЦ. Все параметры проведения процесса экстракции были идентичны (концентрация биомассы составила 5 мг/мл, процесс экстракции проводили при 4 °С).

Результаты приведены на рисунках 3–5, за контроль принимали показатели, полученные при экстракции из биомассы без какой-либо предварительной обработки.

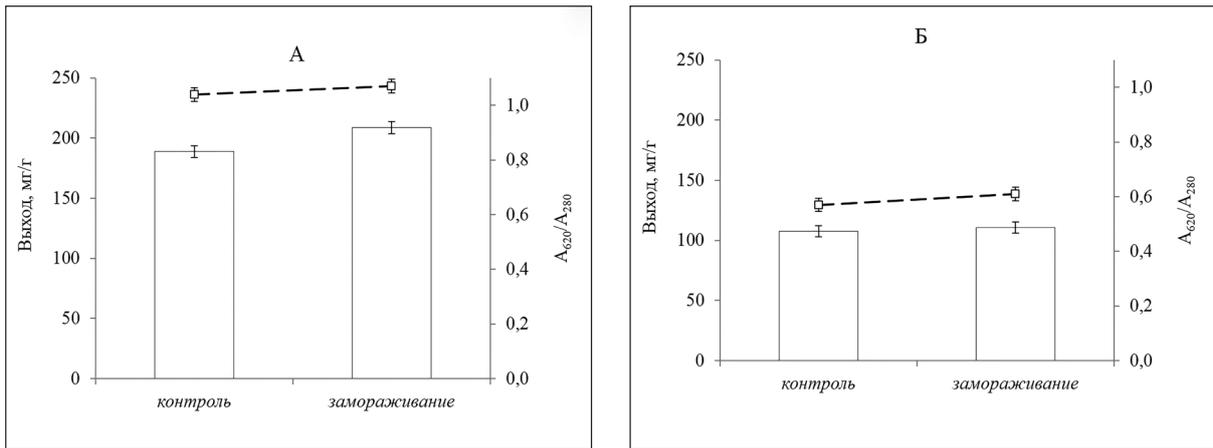


Рис. 3. Влияние предварительного 3-кратного цикла замораживания/оттаивания на выход и чистоту фикоцианина: А – *A. platensis* В-12619; Б – Спирулина НЦ-ВК

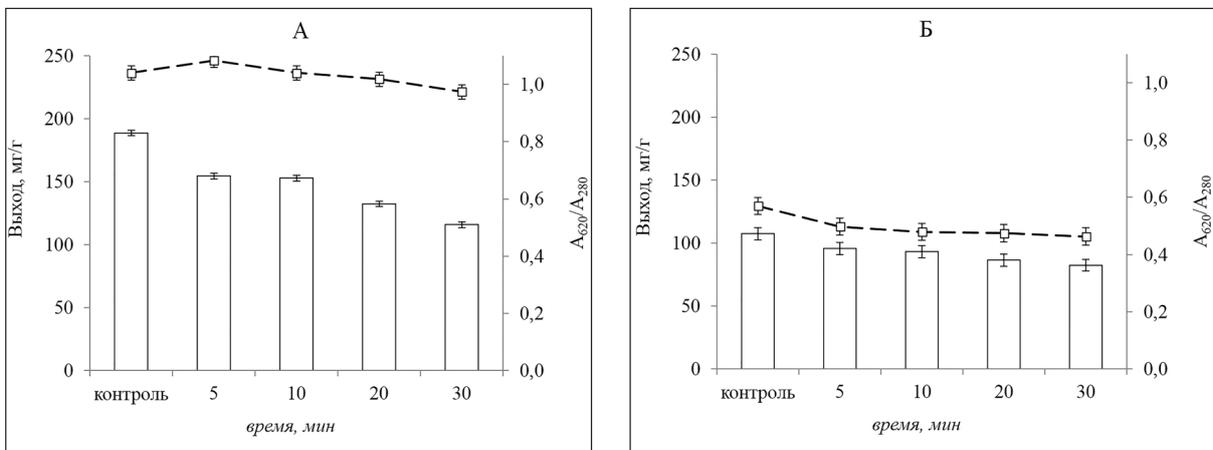


Рис. 4. Влияние предварительной УЗ-обработки (УЗ-ванна) биомассы на выход и чистоту фикоцианина: А – *A. platensis* В-12619; Б – Спирулина НЦ-ВК

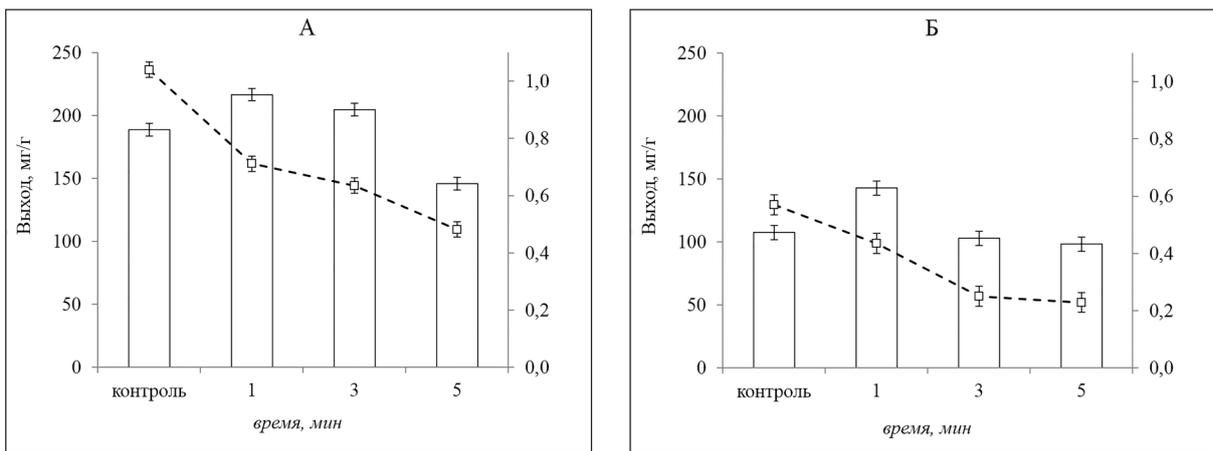


Рис. 5. Влияние предварительной УЗ-обработки (УЗ-гомогенизатор) биомассы на выход и чистоту фикоцианина: А – *A. platensis* В-12619; Б – Спирулина НЦ-ВК

При использовании 3-кратного цикла замораживания/оттаивания выход ФЦ из свежесобранной биомассы *A. platensis* увеличился до 208,8 мг/г, при этом показатель чистоты остался практически неизменным.

Что касается коммерческой биомассы, то рассмотренный способ предварительной обработки биомассы не оказал существенного влияния как на выход ФЦ, так и на его чистоту.

При обработке биомассы (коммерческой и свежесобранной) ультразвуковым гомогенизатором уже на первой минуте происходило разрушение клеток биомассы *A. platensis*, резко увеличивалось содержание водорастворимых примесей, и раствор приобретал зеленый оттенок. Увеличение времени обработки биомассы ультразвуком приводило к разрушению целевого продукта: снижались его выход и чистота (см. рис. 4).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что краткосрочная обработка биомассы цианобактерии с помощью УЗ-гомогенизатора приводила к повышению выхода ФЦ на 15 и 33% для свежесобранной и коммерческой биомассы соответственно; при этом показатель чистоты ФЦ резко снижался: с 1,04 до 0,71 и с 0,57 до 0,44 соответственно.

Обработка биомассы ультразвуком на УЗ-ванне не оказала положительного эффекта как на выход ФЦ, так и на его чистоту (см. рис. 5); следовательно, данный способ предварительной обработки биомассы не является эффективным для выделения ФЦ как из коммерческой, так и свежесобранной биомассы *A. platensis*.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований и оптимизации условий выделения фикоцианина из цианобактерии выход целевого продукта из свежесобранной биомассы *A. platensis* В-12619 был увеличен более чем на 40% (с 144,8 до 208,8 мг/г), при этом его чистота составила 1,07. Содержание фикоцианина в сухой коммерческой биомассе «Спирулина-Сочи НЦ-ВК» изначально было ниже, чем у *A. platensis* В-12619, максимальная чистота при проведении исследований была менее 0,6. Следовательно, для дальнейших исследований фикоцианина целесообразно использовать предложенный способ для свежесобранной биомассы цианобактерии.

Литература

1. Abalde J., Betancourt L., Torres E., Cid A., Barwell C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201 // *Plant Science*. – 1998. – Vol. 136(1). – P. 109–120.
2. Bennett A., Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga // *The Journal of Cell Biology*. – 1973. – Vol. 58(2). – P. 419–435.
3. Boussiba S., Richmond A.E. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis* // *Archives of Microbiology*. – 1979. – Vol. 120(2). – P. 155–159.

4. da Costa Ores J., de Amarante M.C.A., Kalil S.J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans* // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 219. – P. 219–227.
5. de Morais M.G., da Fontoura Prates D., Moreira J.B., Duarte J.H., Costa J.A.V. Phycocyanin from microalgae: Properties, extraction and purification, with some recent applications // *Industrial Biotechnology*. – 2018. – Vol. 14(1). – P. 30–37.
6. Dewi E.N., Kurniasih R.A., Purnamayati L. The application of microencapsulated phycocyanin as a blue natural colorant to the quality of Jelly Candy // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing. – 2018. – Vol. 116(1). – P. 012047. doi: 10.1088/1755-1315/116/1/012047.
7. Güroy B., Karadal O., Mantoğlu S., Cebeci O.I. Effects of different drying methods on C-phycocyanin content of *Spirulina platensis* powder // *Su Ürünleri Dergisi*. – 2017. – Vol. 34(2). – P. 129–132.
8. Kannaujia V.K., Sinha R.P. An efficient method for the separation and purification of phycobiliproteins from a rice-field cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HKAR-11 // *Chromatographia*. – 2016. – Vol. 79(5–6). – P. 335–343.
9. Kumar D., Dhar D.W., Pabbi S., Kumar N., Walia S. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540) // *Indian Journal of Plant Physiology*. – 2014. – Vol. 19(2). – P. 184–188.
10. Liu Q., Huang Y., Zhang R., Cai T., Cai Y. Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycocyanin // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2016. – Vol. 2016. – Article ID: 7803846. doi: 10.1155/2016/7803846.
11. Li W., Su H.N., Pu Y., Chen J., Liu L.N., Liu Q., Qin S. Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects // *Biotechnology Advances*. – 2019. – Vol. 37(2). – P. 340–353.
12. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent // *Biochemical Engineering Journal*. – 2016. – Vol. 109. – P. 282–296.
13. Martelli G., Folli C., Visai L., Daglia M., Ferrari D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications // *Process Biochemistry*. – 2014. – Vol. 49(1). – P. 154–159.
14. Martins N., Roriz C.L., Morales P., Barros L., Ferreira I.C. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices // *Trends in Food Science & Technology*. – 2016. – Vol. 52. – P. 1–15.
15. Moreira I.D., Passos T.S., Chiapinni C., Silveira G.K., Souza J.C., Coca-Vellarde L.G., Deliza R., de Lima Araújo K.G. Colour evaluation of a phycobiliprotein-rich extract obtained from *Nostoc* PCC9205 in acidic solutions and yogurt

- // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2012. – Vol. 92(3). – P. 598–605.
16. Pagels F., Guedes A.C., Amaro H.M., Kijjoo A., Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications // Biotechnology Advances. – 2019. – Vol. 37(3). – P. 422–443.
 17. Paswan M.B., Chudasama M.M., Mitra M., Bhayani K., George B., Chatterjee S., Mishra S. Fluorescence quenching property of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* and its binding efficacy with viable cell components // Journal of Fluorescence. – 2016. – Vol. 26(2). – P. 577–583.
 18. Priyadarshani I., Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review // J. Algal Biomass Utln. – 2012. – Vol. 3(4). – P. 89–100.
 19. Romay C., Ledon N., Gonzalez R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation // Inflammation Research. – 1998. – Vol. 47(8). – P. 334–338.
 20. Romay C.H., Gonzalez R., Ledon N., Ramirez D., Rimbau V. C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects // Current Protein and Peptide Science. – 2003. – Vol. 4(3). – P. 207–216.
 21. Sabarinathan K., Ganesan G. Antibacterial and toxicity evaluation of C-phycoerythrin and cell extract of filamentous freshwater cyanobacterium – *Westiellopsis* sps // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2008. – Vol. 12. – P. 79–82.
 22. Schulze P.S.C., Barreira L.A., Pereira H.G., Perales J.A., Varela J.C. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production // Trends in Biotechnology. – 2014. – Vol. 32(8). – P. 422–430.
 23. Silveira S.T., Burkert J., Costa J.A.V., Burkert C.A.V., Kalil S.J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design // Bioresource Technology. – 2007. – Vol. 98(8). – P. 1629–1634.
 24. Vali Aftari R., Rezaei K., Mortazavi A., Bandani A.R. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycoerythrin: a comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods // Journal of Food Processing and Preservation. – 2015. – Vol. 39(6). – P. 3080–3091.
 25. Vilkhov K., Mawson R., Simons L., Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2008. – Vol. 9(2). – P. 161–169.

OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF ISOLATION OF PHYCOCYANIN FROM CYANOBACTERIA *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

A.S. TRUFANOVA, N.P. BABICHENKO, Ya.E. SERGEEVA

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

As a result of the study, the isolation of phycocyanin from the biomass of cyanobacteria *Arthrospira platensis* was optimized by considering factors such as: biomass concentration (biomass-extractant ratio), extraction temperature, method of biomass pretreatment, which led to an increase in phycocyanin yield from 144.8 mg/g (purity 0.86) to 208.8 mg/g (purity 1.07) in the case of freshly collected biomass of cyanobacteria *Arthrospira platensis* B-12619.

Keywords: phycocyanin, *Arthrospira platensis*.

ПРИМЕНЕНИЕ БИОАНОДА НА ОСНОВЕ *GLUCONOBACTER OXYDANS* ИЗ УГЛЕРОДНОЙ ТКАНИ В ФОТОБИОРЕАКТОРЕ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

М.В. ВИШНЕВСКАЯ*, Ю.М. ПАРУНОВА, П.М. ГОТОВЦЕВ, Р.Г. ВАСИЛОВ

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Микробные топливные элементы (МТЭ) — это многообещающая технология, которая дает возможность генерировать электричество с помощью переработки органических соединений. Данная технология представляется очень перспективной для применения в очистке городских сточных вод, чтобы минимизировать энергетическое потребление очистных сооружений. Главные ограничения в использовании МТЭ заключается в высокой стоимости мембран и электродных материалов. В настоящей статье представлен безмембранный МТЭ с недорогими проводящими электродами, которые впоследствии могут применяться для очистки сточных вод. Как катализатор на аноде использовался штамм микроорганизмов *Gluconobacter oxydans* ВКМВ-1280 из Всероссийской коллекции микроорганизмов. В качестве материала для электродов служила углеродная ткань ТГН-2МК, предоставленная АО «НИИГрафит». Имобилизация микроорганизмов осуществлялась с помощью растворов полимеров поли(3,4-этилендиокситиофен) полистиролсульфоната (PEDOT:PSS) и поли(этиленгликоль) диглицидилового эфира (PEGDE). Эксперименты проводились с использованием синтетического аналога городских сточных вод. Никакого дополнительного химического медиатора не применялось. Электроды были стабильны на протяжении всей работы биотопливной ячейки. Таким образом, был создан новый МТЭ, который после дальнейших усовершенствований может послужить для очистки городских сточных вод.

Ключевые слова: микробный топливный элемент, *Gluconobacter oxydans*, углеродная ткань, фотобиореактор, сточные воды.

Введение

Растущий спрос на энергию в условиях сокращения ископаемого топлива может привести к глобальному энергетическому кризису, который окажет серьезное воздействие на окружающую среду и здоровье человека [15, 16]. Ископаемое топливо, ядерная энергия и возобновляемые источники энергии считаются основными источниками энергии. В последние десятилетия возрос интерес к использованию альтернативных экологически чистых и экономически выгодных источников возобновляемой энергии [6, 7]. Наряду с усиливающимся энергетическим кризисом, быстрая урбанизация, рост населения и индустриализация оказывают огромное влияние на загрязнение окружающей среды. Загрязнение воды является

глобальной проблемой и, тем не менее, сточные воды можно рассматривать как один из лучших источников в качестве субстрата для выработки энергии и питательных веществ для растений [3, 19]. Методы очистки сточных вод включают в себя аэробную обработку активным илом, анаэробный варочный котел, мембранную технологию, ионный обмен, адсорбцию, химическое осаждение, коагуляцию и электролитическое восстановление [11, 21]. Эти технологии имеют такие недостатки, как высокая потребность в электроэнергии и большое количество остаточных загрязнений.

В последнее время технологии биоэлектрохимических систем рассматриваются в качестве альтернативы из-за их потенциальной роли в удалении загрязняющих веществ и выработке электроэнергии из сточных вод с использованием микроорганизмов [9]. Таким образом, микробный топливный элемент способен обрабатывать сточные воды и вырабатывать при этом электроэнергию. МТЭ демонстрируют значительные преимущества, такие как работа при различных температурах (низких или высоких), pH и использование разнообразных загрязнителей в качестве субстрата, прямое преобразование субстрата в энергию с ис-

© 2019 г. Вишневская М.В., Парунова Ю.М., Готовцев П.М., Васильев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Вишневская Мария Владиславовна
аспирант, НИЦ «Курчатовский институт».
отдел биотехнологии и биоэнергетики, Москва
E-mail: Vishnevskaya_MV@nrcki.ru

Материалы и методы

пользованием биокатализатора, небольшое количество остаточных загрязнений в сточных водах по сравнению с традиционными технологиями очистки и отсутствие энергозатрат на аэрацию [10].

Распространенность известных природных экзоэлектрогенов (то есть микроорганизмов, способных переносить электроны внеклеточно) ограничена. Поэтому ряд исследований направлен на поиски штамма бактерий, который позволит МТЭ работать с наибольшей эффективностью для увеличения диапазона потенциальных применений МТЭ. Было показано, что применение бактерии *Gluconobacter oxydans* дает возможность исключить медиатор из анодной области и повысить получаемую мощность [4, 17].

Также существует интерес к поиску общих методов, с помощью которых возможности внеклеточного транспорта электронов могут быть улучшены для увеличения мощности МТЭ. Одним из таких методов является использование электропроводящих полимеров, например, PANI, PEDOT, PP и Os-содержащие редокс полимеры. При помощи электрохимических методик было продемонстрировано улучшение характеристик биоанода МТЭ, модифицированного PEDOT, по сравнению с обычным анодом. Модификация PEDOT увеличивает доступность окислительно-восстановительных активных центров и снижает сопротивление межфазного переноса электронов на биоаноде [12].

Актуальной проблемой в разработке новых МТЭ является поиск более дешевого материала для электродов. Они должны обеспечивать достаточную проводимость, химическую стабильность, биосовместимость и обладать высокой удельной поверхностью [5]. Наиболее распространенным и подходящим по электрохимическим свойствам материалом служат углеродные материалы, такие как графит, графитированные волокна и ткани, углеродные войлоки и пены, а также различные наноматериалы, например, углеродные нанотрубки и графен. Эти материалы дешевле, чем большинство альтернативных материалов для электродов биотопливных элементов, и обладают приемлемыми свойствами для использования в МТЭ [13, 14]. Также углеродные материалы биосовместимы с живыми организмами, нетоксичны и устойчивы к коррозии, поэтому они и интересны для таких применений, как очистка сточных вод.

В настоящей работе была продемонстрирована возможность создания экономически доступного и экологически чистого МТЭ на основе углеродной ткани для очистки сточных вод.

Материалы и реагенты. В данной работе был использован штамм бактерий *G. oxydans* ВКМ В-1280, выращенный на среде состава [17]. В качестве анолита выступала среда «синтетические сточные воды» (ССВ) [18]. Штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris* GKV1 (коллекция НИЦ «Курчатовский институт») был выращен на питательной среде (рН 6,5) состава [8]. В качестве материала электродов использовалась углеродная ткань ТГН-2МК толщиной 0,5 мм в среднем, предоставленная АО «НИИграфит». Иммобилизация микроорганизмов осуществлялась с помощью растворов полимеров поли(3,4-этилендиокситиофен) полистиролсульфоната (PEDOT:PSS) и поли(этиленгликоль) диглицидилового эфира (PEGDE). Солевой мостик представлял собой перевернутую U-образную стеклянную трубку, заполненную агаризованным насыщенным раствором KCl [1].

Испытательный стенд. Экспериментальная установка представляла собой отдельные катодную и анодную камеры, объединяющиеся между собой солевым мостиком. В виде катодной камеры выступал лабораторный фотобиореактор (ФБиР) для культивирования микроводорослей *C. vulgaris*. ФБиР представляет собой емкость из оргстекла с выемкой под барботирование и нишей под магнитную мешалку со съемной крышкой и дополнительным освещением (700 люкс) для поддержания жизнедеятельности микроводорослей (рис. 1).



Рис. 1. Экспериментальная установка

Непосредственно возле катода устанавливался датчик анализатора растворенного кислорода МАРК-1402. В течение всего времени эксперимента в катодной камере поддерживалась концентрация кислорода $\approx 7,7 \pm 0,1$ мг/дм³.

Анодной камерой являлась пластиковая чашка Петри Ø 9 см. Катодная камера была заполнена средой с микроводорослями *S. vulgaris* (≈ 3 л), анодная — средой ССВ (16 мл). Электроды закреплялись с помощью зажимов крокодилов за стенки камер.

Получение биомассы *Gluconobacter oxydans*.

Биомасса бактерий *G. oxydans* была получена из Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Для дальнейшего поддержания роста культуры использовали питательную среду состава: сорбит-D (10%), дрожжевой экстракт (1%), дистиллированная вода и агар (2,5%) для плотной среды [2, 20]. Культивирование (100–150 г) для диспергирования культуры проводили в течение 24 часов при температуре 28 °С. Культивирование для сбора биомассы проводили в течение 20 часов (центрифугирование 15 минут, 10000 об./мин). После сбора биомассы ее промывали холодным стерильным NC раствором (0,9% NaCl, 2 mM CaCl₂) [20] и снова суспензировали в 1 мл NC раствора. Биомассу хранили в холодильнике (+4 °С) до момента использования в эксперименте.

Подготовка электродов. Катод представлял собой прямоугольный отрезок углеродной ткани размером 110×25 мм. В качестве анода использовалась та же ткань размера 50×25 мм с нанесенной на нее бактериальной биомассой (рис. 2). Были проанализированы 2 образца анодов. На образец 1 была нанесена смесь, состоящая из 100 мкл клеток бактерий *G. oxydans*, 100 мкл PEDOT:PSS и 100 мкл PEGDE. На образец 2 — 100 мкл клеток *G. oxydans* и 100 мкл PEDOT:PSS. Полимер PEGDE использовался для лучшей фиксации биоматериала на поверхности, а PEDOT:PSS — для увеличения электропроводности. Площадь рабочей поверхности электрода составляла 6,25 см². Анод сушили при комнатной температуре в течение суток.

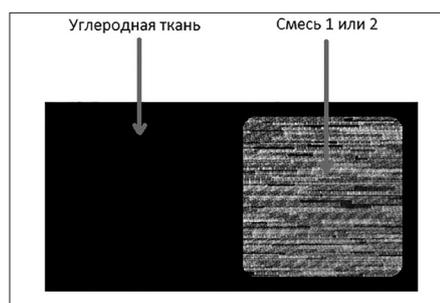


Рис. 2. Схематическое изображение биоанода с нанесенными смесями. Образец 1: *G. oxydans*, PEDOT:PSS, PEGDE. Образец 2: *G. oxydans*, PEDOT:PSS

Электрохимические измерения. Измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) проводились на потенциостате-гальваностате Autolab PGSTAT204 (Mertohm) (ПО NOVA 2.0). Все измерения выполнялись при комнатной температуре (23 ± 1 °С) с заданным напряжением от –300 до +300 и обратно до –300 мВ (без прерывания) со скоростью развертки потенциала 5 мВ/с.

Результаты и обсуждение

По проведенным экспериментам в ФБиОР были рассчитаны ВАХ и построены диаграммы. При выключенной ячейке при $I=0$ А разность потенциалов для образца 1 в первый день эксперимента была –0,16 В, к 14-му составляла –0,325 В. Для образца 2 также значения потенциала открытой цепи изменилось с –0,36 до –0,172 В. При заданной $U=0,3$ В сила тока для образца 1 уменьшалась с 62 до 11,9 мкА, а у образца 2 увеличивалась с 4 до 42,6 мкА за все время проведения экспериментов.

Для наглядной презентации результатов далее представлены графики зависимости тока от напряжения (рис. 3) для обоих образцов анода.

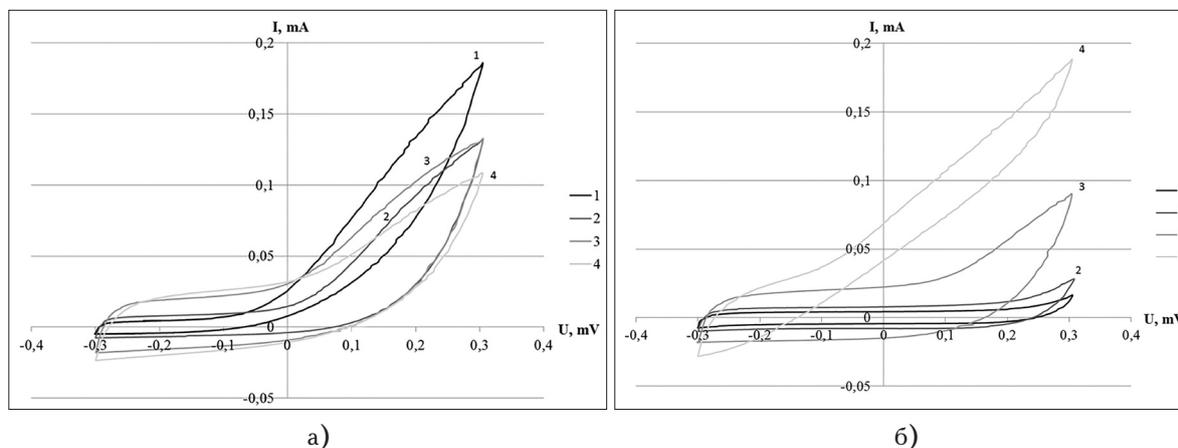


Рис. 3. Диаграмма зависимости тока от напряжения в МТЭ с ФБиОР, где 1 — 1-й день эксперимента, 2 — 6-й день, 3 — 7-й день, 4 — 14-й день: а) для образца биоанода 1 и б) для образца биоанода 2

Результирующий график на рисунке 3 показывает, что ВАХ хорошо коррелирует с формой, представленной в других статьях для МТЭ на основе *G. oxydans* (см. например [4]).

Следующим шагом было вычисление различных характеристик ячейки. Для полного анализа результатов необходимо было получить значения емкости и мощности ячейки. Для расчета средней вместимости использовали следующую формулу 1:

$$C = I/(U/dt), \quad (1)$$

где (C) — емкость, (U) — напряжение, (I) — ток, а (dt) — время измерения для определенного напряжения.

Максимальная емкость ячейки для образца 1 составила в среднем 38,5 мкФ/см² в первый день съема показаний и уменьшилась наполовину в течение двух недель жизни БТЭ. В образце 2 в первый день эксперимента емкость составила 9,1 мкФ/см², а через две недели выросла почти в 10 раз и равнялась 60,7 мкФ/см². Такой эффект роста электроемкости объясняется возможным образованием на поверхности электрода биопленки.

Мощность ячейки рассчитывалась по формуле 2:

$$P=I \times U, \quad (2)$$

где (P) — мощность, (I) и (U) — ток и напряжение, соответственно.

Максимальная плотность мощности ячейки для образца 1 составила 9,1 мкВт/см² в первый день эксперимента и уменьшилась до 5,3 мкВт/см² через две недели. В образце 2 в первый день эксперимента плотность мощности составила 0,8 мкВт/см², а через две недели выросла до 9,2 мкВт/см².

В таблице 1 приведены сводные данные по всем проведенным экспериментам.

Таблица 1

Максимальные значения выходных данных по экспериментам с 2 образцами биоанодов

Измеряемые параметры	Образцы	
	Образец 1	Образец 2
Состав смеси на аноде	<i>G. oxydans</i> PEDOT:PSS PEGDE	<i>G. oxydans</i> PEDOT:PSS
Максимальная емкость, мкФ/см ²	38,5 (1-й день)	60,7 (14-й день)
Максимальная плотность мощности, мкВт/см ²	9,0 (1-й день)	9,2 (14-й день)

Заключение

Полученные результаты показывают возможность создания МТЭ. Отсутствие медиатора, дешевизна электродных материалов и простота конструкции делают его отличной перспективой для применения в муниципальных очистных сооружениях. Разработанная ячейка демонстрирует максимальную выходную мощность 9,2 мкВт/см² при напряжении 0,3 В. Необходимо отметить, что максимальной полученной выходной мощности все же недостаточно для применения МТЭ в качестве источника питания очистных сооружений, поэтому дальнейшие исследования будут направлены на повышение эффективности.

Литература

1. Девис С., Джеймс А. Электрохимический словарь. — М.: Мир, 1979. — 288 с.
2. Решетиллов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Арляпов В.А., Колесов В.В., Гуторов М.А., Готовцев П.М., Васильев Р.Г. Влияние некоторых углеродных наноматериалов на окисление этилового спирта бактериальными клетками *Gluconobacter oxydans* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — Vol. 53(1). — С. 115–122.
3. Abbasi T., Abbasi S.A. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors // Renew. Sustain. Energy Rev. — 2012. — Vol. 16(3). — P. 1696–1708.
4. Alferov S., Minaicheva P., Arlyapov V., Asulyan L., Alferov V., Ponamoreva O., Reshetilov A. Bioanode for a microbial fuel cell based on *Gluconobacter oxydans* immobilized into a polymer matrix // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2014. — Vol. 50. — P. 637–643.
5. Alferov V., Vasilov R., Gubin S. The biofuel elements on the basis of the nanocarbon materials // RENSIT. — 2014. — Vol. 6. — P. 187–208.
6. Aziz S., Memon A.R., Shah S.F., Soomro S.A., Parkash A. Prototype designing and operational aspects of microbial fuel cell-review paper // Sci. Int. — 2013. — Vol. 25. — P. 49–56.
7. Choudhury P., Uday U.S.P., Mahata N., Tiwari O.N., Ray R.N., Bandyopadhyay T.K., Bhunia B. Performance improvement of microbial fuel cells for waste water treatment along with value addition: A review on past achievements and recent perspectives // Renew. Sustain. Energy Rev. — 2017. — Vol. 79. — P. 372–389.
8. Gorin K.V., Sergeeva Ya.E., Butylin V.V., Komova A.V., Poyidaev V.M., Badranova G.U., Shapovalova A.A., Konova I.A., Gotovtsev P.M. Methods coagulation/flocculation and flocculation with ballast agent for effective harvesting of microalgae // Bioresource Technology. — 2015. — Vol. 193. — P. 178–184.

9. Gude V.G. J. Wastewater treatment in microbial fuel cells – an overview // J. of Clean. Prod. – 2016. – Vol. 122. – P. 287–307.
10. He L., Du P., Chen Y., Lu H., Cheng X., Chang B., Wang Z. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment // Renew. Sustain. Energy Rev. – 2017. – Vol. 71. – P. 388–403.
11. Kurniawan T.A., Chan G.Y., Lo W.H., Babel S. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals // Chem. Eng. J. – 2006. – Vol. 118. – P. 83–98.
12. Liu X., Wu W., Gu Z. Poly (3,4-ethylenedioxythiophene) promotes direct electron transfer at the interface between *Shewanella loihica* and the anode in a microbial fuel cell // Journal of Power Sources. – 2015. – Vol. 277. – P. 110–115.
13. Ma'arof M., Chala G., Ravichanthiran S., Diasip A. A study on microbial fuel cell (MFC) with graphite electrode to power underwater monitoring devices // IJMET. – 2018. – Vol. 9. – P. 98–105.
14. Mustakeem. Electrode materials for microbial fuel cells: nanomaterial approach // Materials for Renewable and Sustainable Energy. – 2015. – Vol. 4. – Article number: 22. doi:10.1007/s40243-015-0063-8.
15. Rahimnejad M., Ghoreyshi A., Najafpour G., Jafary T. Power generation from organic substrate in batch and continuous flow microbial fuel cell operations // Applied Energy. – 2011. – Vol. 88. – P. 3999–4004.
16. Rahimnejad M., Ghoreyshi A., Najafpour G., Younesi H., Shakeri M. A novel microbial fuel cell stack for continuous production of clean energy // International Journal of Hydrogen Energy. – 2012. – Vol. 37. – P. 5992–6000.
17. Reshetilov A., Plekhanova Yu., Tarasov S., Arlyapov V., Kolesov V., Gutorov M., Gotovtsev P., Vasilov R. Effect of some carbon nanomaterials on ethanol oxidation by *Gluconobacter oxydans* bacterial cells // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – Vol. 53. – P. 123–129.
18. Salgueiro J., Pérez L., Maceiras R., Sánchez A., Cancela A. Semicontinuous culture of *Chlorella vulgaris* microalgae for wastewater treatment // International Journal of Environmental Research. – 2018. – Vol. 12. – P. 765–772.
19. Tauseef S.M., Abbasi T., Abbasi S.A. Energy recovery from wastewaters with high-rate anaerobic digesters // Renew. Sustain. Energy Rev. – 2013. – Vol. 19. – P. 704–741.
20. Vostiar I., Ferapontova E., Gorton L. Electrical «wiring» of viable *Gluconobacter oxydans* cells with a flexible osmium-redox polyelectrolyte // Electrochemistry Communications. – 2004. – Vol. 6. – P. 621–626.
21. Wang Y.H., Lin S.H., Juang R.S. J. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions using various low-cost adsorbents // Hazard Mater. – 2003. – Vol. 102. – P. 291–302.

THE USE OF CARBON TEXTILE BIOANODE BASED ON *GLUCONOBACTER OXYDANS* IN PHOTOBIOREACTOR FOR WASTEWATER TREATMENT

M.V. VISHNEVSKAYA, Yu.M. PARUNOVA, P.M. GOTOVTSEV, R.G. VASILOV

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

Microbial fuel cells (MFC) is a promising technology that makes it possible to generate electricity through the processing of organic compounds. This technology is very perspective for use in urban wastewater treatment to minimize the energy consumption. The main limitations in the use of MFC are the high cost of membranes and electrode materials. This article presents a membraneless MFC with non-expensive conductive electrodes, which can be used for wastewater treatment. A strain of microorganisms *Gluconobacter oxydans* VKM B-1280 was used as a catalyst on the anode. The carbon textile TGN-2MK was used as the material for the electrodes. Microorganisms immobilization was carried out a polymer solutions of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate (PEDOT:PSS) and poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE). The experiments were carried out using a synthetic analogue of urban wastewater without additional chemical mediator. The electrodes were stable throughout the biofuel cell life. Thus, a new MFC was created, which after further improvements can be used to urban wastewater treatment.

Keywords: microbial fuel cell, *Gluconobacter oxydans*, carbon textile, photobioreactor, wastewater treatment.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA FERGUSONII* E3 И *ESCHERICHIA COLI*

Л.К. БУКУРУ, Е.Е. ЗИНУРОВА, Т.В. БАГАЕВА*

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета

Проведен сравнительный анализ ферментов углеводного обмена у изолятов, выделенных из ЖКТ здоровых и больных людей с болезнью Крона. Установлено, что воспалительный процесс ЖКТ сопровождается увеличением активности большинства гидролитических ферментов углеводного обмена. Рост активности ферментов наблюдался как в случае эндогенных, так и экзогенных ферментов. Однако в клеточных экстрактах он был наиболее выражен. Среди исследуемых ферментов *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli*, таких как амилазы, глюкозидазы, галактозидазы, сахаразы и целлюлазы, наибольшая активность была обнаружена у β -галактозидазы *Escherichia fergusonii* E3 в клеточных экстрактах.

Ключевые слова: бактерии, желудочно-кишечный тракт, ферменты углеводного обмена, болезнь Крона.

Введение

Ферменты микроорганизмов широко используются во многих отраслях промышленности. Однако, несмотря на многообразие коммерческих препаратов, выпускаемых биотехнологическим производством, идет постоянный поиск новых, эффективных продуцентов. Одним из таких источников можно рассматривать микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Разнообразное микробное сообщество, обитающее в ЖКТ человека, обладает обширным метаболическим ресурсом [2, 4, 12, 15]. Кроме того, активность данного микробного сообщества значительно возрастает при воспалительных заболеваниях [2]. Как показали недавние исследования, при воспалительных заболеваниях ЖКТ происходит ряд существенных изменений, таких как: глобальное изменение состава кишечной микрофлоры в пользу увеличения содержания патогенных бактерий, главным образом, семейства *Enterobacteriaceae*, нарушение процессов транскрипции, меняется пул метаболитов, наблюдаются значительные биохимические изменения [9, 14]. Установленный рост численности микроорганизмов при воспалительных заболеваниях ЖКТ обуславливает их конкуренцию за суб-

страт, что, в свою очередь, предполагает активацию всего гидролитического комплекса данных микроорганизмов, в том числе и углеводного обмена [3].

Целью настоящей работы было изучение изменения активности ферментов углеводного обмена при болезни Крона.

Материалы и методы

В работе использовали бактерии *Escherichia coli*, выделенные из ЖКТ здоровых людей, и *Escherichia fergusonii* E3 — из ЖКТ пациентов с болезнью Крона, музея культур кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета.

Культивирование бактерий осуществляли в мясопептонном бульоне рН 7,0, в микроаэрофильных условиях роста при температуре 37 °С, в течение 48 часов.

Рост бактерий и накопление биомассы регистрировали на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ при длине волны 750 нм.

Разделение биомассы и культуральной жидкости осуществляли центрифугированием при 10 000 об./мин в течение 15 минут на центрифуге Rotina-380R.

Определение активности ферментов углеводного обмена у бактерий *Escherichia coli* и *Escherichia fergusonii* E3 осуществляли в клеточных экстрактах и в культуральной жидкости после 24 часов культивирования.

Для получения клеточных экстрактов биомассу промывали буферным раствором рН 7,4 и разрушали

© 2019 г. Букуру Л.К., Зинурова Е.Е., Багаева Т.В.

* Автор для переписки:

Багаева Татьяна Вадимовна

д.б.н., проф. каф. кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

E-mail: tatbag@rambler.ru

бактериальные клетки с помощью гидролиза лизоцимом с ЭДТА в течение 20 минут при 37 °С [13].

Определение α -амилазной и β -амилазной активности проводили по принятому методу анализа, используя в качестве субстрата 1% раствор крахмала или 0,5 М гликогена [1]. Поглощение измеряли в 3 см кюветах при 540 нм на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ.

Определение α -глюкозидазной и β -глюкозидазной активности проводили по методу, предложенному Бисвангером с модификациями [1]. В качестве субстрата использовали 0,5 М раствор мальтозы или 5% раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ).

Для определения сахарозной активности в качестве субстрата готовили 0,3 М сахарозу [1]. Определение активности целлюлазы и β -галактозидазы проводили по методу Кенига с соавторами при их модификации (König et al., 2002) [7]. Для определения β -галактозидазной активности и целлюлазной активности в качестве субстрата готовили 1%-ный раствор лактозы и раствор карбоксиметилцеллюлозы. Выход восстанавливающих сахаров определяли по калибровочным графикам, построенным по глюкозе [7].

Для определения удельной активности фермента в клеточных экстрактах и культуральной жидкости определяли содержание белка по методу Лоури с использованием альбумина бычьей сыворотки (BSA) в качестве стандарта [10].

Все эксперименты проводились в трех повторностях, результаты анализа выражали как среднее значение и стандартную ошибку отклонения проведенных опытов.

Результаты и обсуждение

Ферментная система бактерий углеводного обмена включает в себя ряд ферментов, таких как амилаза, глюкозидаза, целлюлаза, сахараза, галактозидаза. В наших экспериментах мы решили сравнить активность данных ферментов у бактерий ЖКТ здоровых и больных людей.

Результаты исследований показали, что среди ферментов углеводного обмена наиболее высокая активность у изолята *Escherichia fergusonii* E3 наблюдалась при определении β -галактозидазы. В качестве субстрата для данной реакции использовали 1%-ный раствор лактозы. Выделенный изолят *Escherichia fergusonii* E3 при патологии имел высокую β -галактозидазную активность как в культуральной жидкости, так и в клеточных экстрактах по сравнению с β -галактозидазой *Escherichia coli* нормы. Особенно значительное отличие в активности ферментов наблюдалось в клеточном экстракте, когда активность β -галактозидазы изолята *Escherichia fergusonii* E3 была

значимо выше ($p=0,000013$), чем у бактерий *Escherichia coli* (рис. 1–2, табл. 1).

Следующей по активности ферментов у изолята *Escherichia fergusonii* E3 была α -амилаза. Для определения α -амилазной активности в качестве субстрата использовался раствор крахмала. Результаты исследований показали, что оба вида бактерий: и *Escherichia fergusonii* E3, и *Escherichia coli* синтезируют α -амилазу. Более высокая α -амилазная активность (в 1,5–2,0 раза) обнаруживалась у штаммов в культуральной жидкости, причем активность α -амилазы изолята *Escherichia fergusonii* E3 была значимо выше (в 1,7 раза) ($p=0,000066$) по сравнению с ферментом, синтезируемым *Escherichia coli* (см. рис. 1–2, табл. 1).

Для определения β -амилазной активности штаммов в качестве субстрата использовался раствор гликогена. Результаты исследований продемонстрировали, что бактерии *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli* также синтезируют и β -амилазу, причем ее активность в культуральной жидкости была выше, чем в клеточных экстрактах. Сравнение активностей данного фермента у *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli* выявило более высокую β -амилазную активность у изолята *Escherichia fergusonii* E3, как в клеточных экстрактах ($p=0,005114$), так и в культуральной жидкости ($p=0,016215$) по сравнению со штаммом *Escherichia coli* (см. рис. 1–2, табл. 1).

Определение α -глюкозидазной активности штаммов проводилось при использовании в качестве субстрата раствора мальтозы в ацетатном буфере при pH 6,0. В данном варианте опыта было установлено, что более высокая активность фермента (в 2,0 раза — *Escherichia coli* и в 4,0 раза — *Escherichia fergusonii* E3) наблюдалась также в культуральной жидкости. Активность α -глюкозидазы *Escherichia fergusonii* E3 в культуральной жидкости и в данном случае была в 2,8 раза выше ($p=0,002456$), чем у фермента *Escherichia coli*, и незначительно выше ($p=0,363669$), $p>0,05$ — в клеточном экстракте.

Несколько иные результаты были получены при определении β -глюкозидазной активности. В данных экспериментах в качестве гидролизуемого субстрата использовали раствор целлобиозы. Результаты исследований показали, что наибольшая активность β -глюкозидазы была обнаружена у бактерий *Escherichia coli* в культуральной жидкости (см. рис. 1). Активность β -глюкозидазы *Escherichia fergusonii* E3 в культуральной жидкости также была сравнительно высокой, но значительно ниже ($p=0,011131$), чем у бактерий *Escherichia coli*. Однако в клеточных экстрактах активность β -глюкозидазы *Escherichia fergusonii* E3 была значительно выше (в 4,02 раза), $p=0,000380$, чем у *Escherichia coli*.

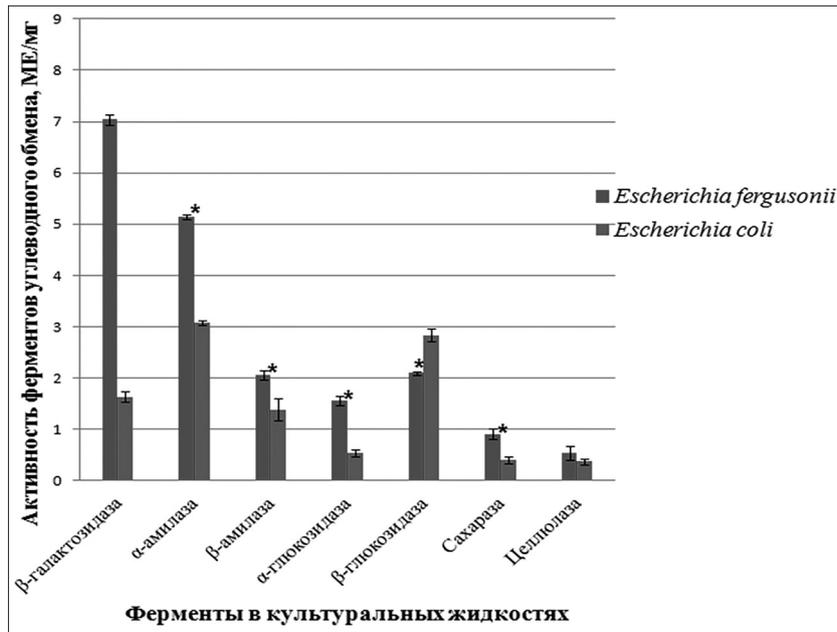


Рис. 1. Определение активности ферментов углеводного обмена в культуральных жидкостях у *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli*. Результаты представлены в виде среднего значения ± 2 стандартных отклонения (n=3), * $p < 0,05$

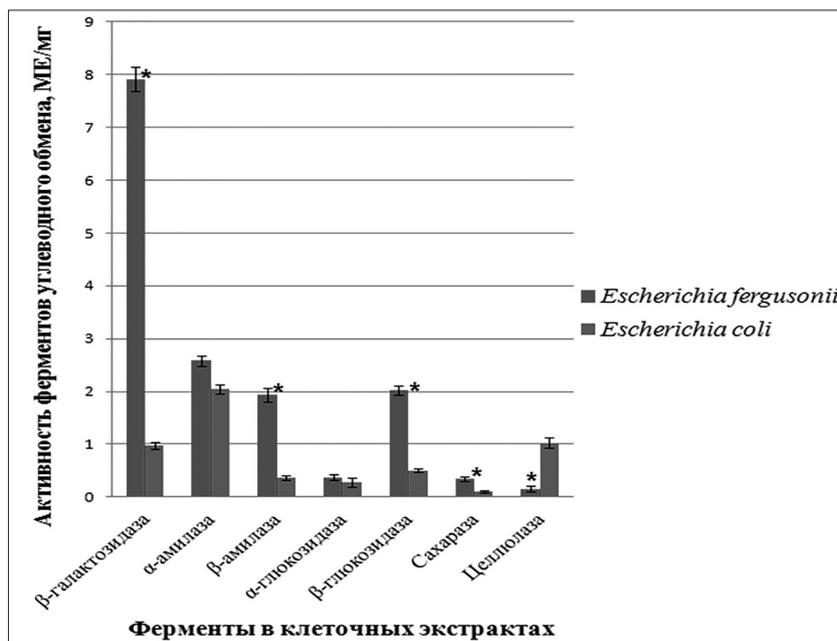


Рис. 2. Определение активности ферментов углеводного обмена в клеточных экстрактах у *Escherichia fergusonii* E3 и *Escherichia coli*. Результаты представлены в виде среднего значения ± 2 стандартных отклонения (n=3), * $p < 0,05$

Ферменты сахаразы и целлюлаза проявляли относительно невысокие ферментативные активности у штаммов. Однако и в данном варианте опытов наблюдалось значимое увеличение ($p=0,02$) активности сахаразы у изолята, выделенного из ЖКТ пациентов с болезнью Крона, как в культуральной жидкости, так и в клеточных экстрактах, по сравнению с ферментами бактерий нормальной микрофлоры. Тенденция уве-

личения активности ферментов у изолята *Escherichia fergusonii* E3 в культуральной жидкости по сравнению с ферментами у бактерий из нормы наблюдалась также и при определении целлюлазной активности. Однако активность целлюлазы клеточных экстрактов изолята *Escherichia fergusonii* E3 была более низкой, $p=0,004273$, по сравнению с ферментом *Escherichia coli* (см. рис. 1–2, табл. 1).

Значения активности ферментов углеводного обмена у *Escherichia fergusonii* и *Escherichia coli*

Ферменты	Вид	Активность ферментов углеводного обмена			
		Культуральная жидкость		Клеточные экстракты	
		Активность, МЕ/мл	Удельная активность, МЕ/мг	Активность, МЕ/мл	Удельная активность, МЕ/мг
β -галактозидаза	<i>Escherichia coli</i>	1,72±0,03	1,64±0,11	0,89±0,20	0,97±0,06
	<i>Escherichia fergusonii</i>	5,49±0,32	7,04±0,11	5,65±0,05	7,92±0,22*
α -амилаза	<i>Escherichia coli</i>	3,23±0,31	3,08±0,04	1,89±0,11	2,05±0,09
	<i>Escherichia fergusonii</i>	4,01±0,20	5,14±0,05*	1,83±0,16	2,58±0,10
β -амилаза	<i>Escherichia coli</i>	1,50±0,33	1,39±0,21*	0,33±0,12	0,36±0,05
	<i>Escherichia fergusonii</i>	1,57±0,28	2,05±0,09*	1,38±0,12	1,94±0,13*
α -глюкозидаза	<i>Escherichia coli</i>	0,57±0,03	0,54±0,06	0,25±0,04	0,27±0,09
	<i>Escherichia fergusonii</i>	1,17±0,16	1,57±0,09*	0,27±0,07	0,38±0,05
β -глюкозидаза	<i>Escherichia coli</i>	2,98±0,07	2,84±0,13	0,46±0,35	0,50±0,03
	<i>Escherichia fergusonii</i>	1,63±0,25	2,09±0,03*	1,43±0,09	2,01±0,09*
целлюлаза	<i>Escherichia coli</i>	0,39±0,10	0,37±0,05	0,92±0,08	1,03±0,10
	<i>Escherichia fergusonii</i>	0,42±0,14	0,54±0,13*	0,11±0,02	0,15±0,05*
сахараза	<i>Escherichia coli</i>	0,42±0,03	0,41±0,06	0,09±0,01	0,10±0,01
	<i>Escherichia fergusonii</i>	0,71±0,04	0,91±0,10	0,24±0,10	0,34±0,05*

Примечание: результаты представлены в виде среднего значения ± 2 стандартных отклонения (n=3), * $p < 0,05$

Заключение

Суммируя полученные результаты проведенных экспериментов, можно сказать, что активность большинства ферментов углеводного обмена у изолята *Escherichia fergusonii* ЕЗ, выделенного из ЖКТ пациентов с болезнью Крона, была значительно выше ($p < 0,05$) активности ферментов углеводного обмена *Escherichia coli*, выделенного из ЖКТ здоровых людей. Таким образом, ЖКТ может быть источником новых ферментных препаратов с высокой активностью.

Среди изученных ферментов наибольшая активность наблюдалась у фермента β -галактозидазы *Escherichia fergusonii* ЕЗ. β -галактозидаза катализирует гидролитический процесс расщепления β -1,4-D-галактозидных связей лактозы с образованием D-глюкозы и D-галактозы в качестве конечного продукта. β -галактозидаза широко используется при производстве молочных продуктов с низким содержанием лактозы, катализирует реакции трансгалактозилирования, трансформируя лактозу в смесь галактоолигосахаридов различного состава, находит применение при решении экологических проблем [5, 8, 11]. Можно предположить, что и β -галактозидаза *Escherichia fergusonii* ЕЗ найдет свое применение.

Литература

1. Биссвангер Х. Практическая энзимология, лаборатория знаний. — М.: Бином, 2010. — 328 с.
2. Князев О.В., Каграманова А.В., Чернова М.Е., Корнеева И.А., Парфенов А.И. *Clostridium difficile* при воспалительных заболеваниях кишечника // Терапевтический архив. — 2018. — Т. 11. — С. 32–36.
3. Christa B.L., Gizdataullina A.R., Zinurova E.E., Bagaeva T.V. Analysis of changes in the gastrointestinal microflora in normal and abnormal state and identification of individual strains of possible inflammatory disease agents // Eurasia J. Biosci. — 2019. — Vol. 13. — P. 1419–1422.
4. Flint H.J., Scott K.P., Duncan S.H., Louis P., Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut // Gut Microbes. — 2012. — Vol. 3. — No. 4. — P. 289–306.
5. Gopalakrishnan V.K., Palaniswamy M., Vidya B. Screening and optimization of β -galactosidase from fungal strains by using agro residues // World J. Pharmacy and Pharmaceutical Science. — 2014. — Vol. 3. — No. 6. — P. 1809–1821.
6. Hamer H.M., De Preter V., Windey K., Verbeke K. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? // American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology. — 2012. — Vol. 302. — No. 1. — P. 1–9.
7. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of xylanase, glucanase, and cellulase activity // Anal. Bioanal. Chem. — 2002. — Vol. 37. — P. 80–87.

8. Liu Y., Chen Z., Jiang Z., Yan Q., Yang S. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 104. – P. 1055–1063.
9. Lloyd-Price J., Arze C., Ananthkrishnan A.N., Schirmer M., Avila-Pacheco J., Poon T.W. et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases // Nature. – 2019. – Vol. 569. – P. 655–662.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 192. – P. 265–275.
11. Maity M.M., Sanyal S., Bhowal J., Bhattacharyya D.K. Studies on isolation and characterization of lactase produced from soil bacteria // Research Journal of Recent Sciences. – 2013. – Vol. 2. – No. 8. – P. 92–94.
12. Nishida A., Inoue R., Inatomi O., Bamba S., Naito Y., Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease // Clin. J. Gastroenterol. – 2017. – Vol. 11. – P. 1–10.
13. Prasad L.N., Ghosh B.C., Sherkat F., Shah N.P. Extraction and characterisation of β -galactosidase produced by *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 grown in whey // International Food Research Journal. – 2013. – Vol. 20(1). – P. 487–494.
14. Siniagina M., Markelova M., Laikov A., Boulygina E., Khusnutdinova D., Kharchenko A., Misbakhova A., Grigoryeva T. Cultivated *Escherichia coli* diversity in intestinal microbiota of Crohn's disease patients and healthy individuals: Whole genome data // Data in Brief. – 2019. – Vol. 28. – P. 1–6.
15. Volkmann E.R., Hoffmann-Vold A-M., Chang Y-L., Jacobs J.P., Tillisch K., Mayer E.A., Clements P.J., Hov J.R., Kummen M., Midtvedt V., Lagishetty O., Chang L., Labus J.S., Molberg O., Braun J. Systemic sclerosis is associated with specific alterations in gastrointestinal microbiota in two independent cohorts // BMJ Open Gastro. – 2017. – Vol. 3. – P. 1–9.

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF CARBOHYDRATE EXCHANGE ENZYMES IN BACTERIA *ESCHERICHIA FERGUSONII* E3 AND *ESCHERICHIA COLI*

L.C. BUKURU, E.E. ZINUROVA, T.V. BAGAEVA

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

A comparative analysis of enzymes of carbohydrate metabolism in isolates obtained from the gastrointestinal tract of healthy and sick people with Crohn's disease was carried out. It was established that the inflammatory process of the gastrointestinal tract is accompanied by an increase in the activity of most hydrolytic enzymes of carbohydrate metabolism. A surge in enzyme activity was observed both in the case of endogenous and exogenous enzymes. However, in cell extracts it was most pronounced. Among the studied enzymes of *Escherichia fergusonii* E3 and *Escherichia coli*, including amylases, glucosidases, galactosidases, sucrase and cellulases, the highest activity in cell extracts was found in *Escherichia fergusonii* E3 β -galactosidases.

Keywords: bacteria, gastrointestinal tract, carbohydrate metabolism enzymes, Crohn's disease.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ И ЛАТЕКСНЫХ ДИАГНОСТИКУМОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

И.В. ЖАРНИКОВА, Е.В. ЖДАНОВА, Т.В. ЖАРНИКОВА, О.Л. СТАРЦЕВА, С.А. КУРЧЕВА*, А.С. ГЕОГДЖАЯН, А.А. СЕМИРЧЕВА, А.Г. КОШКИДЬКО, Ю.Ю. ГАРКУША

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

Проведен сравнительный анализ биотехнологии получения эритроцитарных и латексных иммуноглобулиновых диагностикумов и методов выявления возбудителя туляремии на основе реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и реакции латексной агглютинации (РАЛ). Химические свойства латексных микроносителей относительно постоянны и поддаются более легкой и точной характеристике по сравнению с поверхностными свойствами наружной мембраны эритроцитов, которые широко варьируют в зависимости от таких условий, как пол, возраст, гормональный статус животного-производителя и времени взятия крови. Методы предварительной обработки также оказывают значительное влияние на стабильность эритроцитарных диагностикумов. Для получения стабильных эритроцитарных диагностикумов экспериментально проводили подбор метода формализации и активирования эритроцитов. Латексные микроносители не нуждаются в предварительной подготовке и могут иметь перспективы использования в условиях, не предусматривающих применения инструментального учета. Проведенные исследования сравнения РНГА и РАЛ указывают на то, что по чувствительности ($7,8 \times 10^5 - 1,56 \times 10^6$ м.к./мл ($t=1$) и выше) и специфичности (отсутствие перекрестных реакций с гетерологичными штаммами) реакция агглютинации латекса с приготовленным туляреминым полиакролеиновым диагностикумом не уступает по этим показателям РНГА с эритроцитарным диагностикумом.

Ключевые слова: эритроциты барана, латекс, иммобилизация, штаммы туляреминого микроба, реакция непрямой гемагглютинации, реакция латексной агглютинации.

Введение

Лабораторная диагностика туляремии имеет важнейшее значение в комплексе противоэпидемических мероприятий и складывается из индикации и идентификации возбудителя или его специфических антигенов и определения сывороточных антител у человека и восприимчивых животных. При этом, как правило, на практике предпочтение отдается серологическим и молекулярно-генетическим методам, характеризующимся экспрессностью, высокой специфичностью, чувствительностью, адаптированным для прямого исследования самых разнообразных объектов биотической и абиотиче-

ской природы. В настоящее время остается актуальным применение иммобилизованных препаратов, в которых используются туляреминые иммуноглобулины, взаимодействующие с твердыми биологическими или синтетическими матрицами: эритроцитами и латексом [1, 7]. К твердым носителям, используемым для приготовления высокоактивных и специфичных диагностических препаратов, традиционно предъявляются высокие требования, такие как наличие активных функциональных групп для обеспечения эффективного связывания биологических агентов (иммуноглобулинов); также они должны быть монодисперсными и стабильными.

Для достижения максимальной чувствительности методов (РНГА, РАЛ) необходимо определение наиболее эффективных способов стабилизации эритроцитов и латексов и оптимальных условий взаимодействия твердых матриц с иммуноглобулинами.

Цель работы заключалась в сравнении биотехнологии получения разработанных ранее эритроцитарных и латексных иммуноглобулиновых диагностикумов и методов РНГА и РАЛ, предназначенных для выявления возбудителя туляремии.

© 2019 г. Жарникова И.В., Жданова Е.В., Жарникова Т.В., Старцева О.Л., Курчева С.А., Геогджаян А.С., Семирчева А.А., Кошкидько А.Г., Гаркуша Ю.Ю.

* **Автор для переписки:**

Курчева Светлана Александровна

к.б.н., зав. научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: kurcheva@yandex.ru

Материалы и методы

Сравнительный анализ проводился путем сравнения биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов (по 25 серий) и методов постановки РНГА и РАЛ с разработанными препаратами (каждой серии в трехкратной повторности).

Для получения латексных диагностикумов применялась латексная основа (акролар К), полученная из ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН.

Для приготовления эритроцитарного диагностикума были выбраны эритроциты барана, полученные в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации [3] и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [8].

Стабилизацию эритроцитов проводили с помощью водного раствора формальдегида (формалина) по методу R. Weinbach (1958) в нашей модификации, заключающейся в сокращении длительности этапов сенсибилизации эритроцитов и их шуттелирования.

Формализацию эритроцитов осуществляли следующим образом: дефибринированную кровь барана фильтровали и осаждали на центрифуге в течение 15 ± 5 минут при 2000 об/мин в 0,9%-ном растворе хлорида натрия. Супернатант удаляли, а осадок эритроцитов отмывали 0,9%-ным раствором хлорида натрия. К полученному объему эритроцитов добавляли равный объем 0,9%-ного раствора хлорида натрия, подогретого до температуры 37 ± 1 °С с рассчитанным количеством формалина и помещали на шуттель-аппарат на 16–18 ч при температуре 22 ± 4 °С. По окончании процесса формализации эритроциты осаждали центрифугированием, четырежды отмывали 10-кратным объемом 0,9%-ного раствора хлорида натрия (по 10 минут при 2000 об/мин). После этого доводили объем эритроцитов 0,9%-ным раствором хлорида натрия до первоначального. В качестве консерванта использовали 1,0%-ный раствор формалина. Полученные эритроциты хранили в холодильнике при температуре 5 ± 3 °С.

Иммуноглобулины, используемые для приготовления диагностикумов, фракционировали каприловой кислотой из гипериммунных туляремийных кроличьих сывороток, которые были получены по разработанным ранее схемам [6].

Для обработки оптимальной концентрации взвеси эритроцитов при их взаимодействии с иммуноглобулинами были испытаны различные концентрации формализованных эритроцитов барана — наилучшие результаты удалось получить при использовании 20% взвеси. В качестве конъюгирующего агента для сенсибилизации эритроцитов испытаны следующие реагенты в различных концентрациях: первичный алкилсульфат натрия от 0,25 до 2,0%, с кратным шагом — 2 и вторичный алкилсульфат натрия в тех же концентрациях. Чувствительность эритроцитарных диагностикумов, при изготовлении которых использовался вторичный алкилсульфат натрия в концентрации 2,0%, при контрольных постановках РНГА составлял $1,56 \times 10^6$ м.к./мл; спонтанной агглютинации эритроцитов не наблюдалось. Экспериментально установлены оптимальные параметры эффективной сенсибилизации иммуноглобулинами формализованных эритроцитов: время экспозиции — 12 ч при температуре 45 °С и рН 5,0.

Принимая во внимание преимущество полиакролеиновых латексных частиц перед другими микросферами, обусловленное наличием альдегидных групп на их поверхности, легко образующих ковалентную связь с аминокруппами белков, были проведены исследования по разработке биотехнологии получения латексных диагностикумов. В работе использовали латекс малинового цвета, средний диаметр частиц $1,2 \pm 0,1$ мкм. Экспериментальные исследования по сенсибилизации 2,0% взвеси частиц полимерного носителя осуществляли с различной концентрацией иммуноглобулинов туляремийных. К смесям добавляли 2,0 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида, рН ($7,3 \pm 0,1$) и выдерживали от 1 до 15 ч при температурах 24 ± 4 °С, 36 ± 1 °С и 50 ± 1 °С на магнитной мешалке. Далее суспензию осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 4–5 минут и дважды отмывали от несвязавшегося белка. Осадок суспендировали в растворе белкового стабилизатора с добавлением 0,1% формалина, полученного по методике [2] (в разведении 1:50), до конечной концентрации 0,2%. В результате экспериментов определены оптимальные условия сенсибилизации: концентрация иммуноглобулинов туляремийных при взаимодействии с полиакролеиновыми латексными частицами составила 200 ± 5 мкг/мл; экспозиция — 9 часов при температуре 50 °С. рН разводящей жидкости оказывает значительное влияние на результаты постановки реакции: так, экспериментально подтверждено снижение активности препаратов при уменьшении рН до 5,0, явление спонтанной агглютинации наблюдалось при увеличении рН до 9,0.

Сравнительный анализ методов постановки РНГА и РАЛ осуществлялся по определению чувствительности и специфичности. Контроль чувствительности РНГА и РАЛ проводили на гомологичных (*F. tularensis* 890; *F. tularensis* 15НИИЭГ; *F. tularensis* Schu) и гетерологичных (*B. abortus* 544; *B. melitensis* 16-М; *B. suis* 1330; *Y. enterocolitica* 64; *Y. enterocolitica* 178; *Y. enterocolitica* 383) штаммах. Работу проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 и СП 1.3.2322-08 в нормальных климатических условиях [4, 5].

Для постановки серологических реакций РНГА и РАЛ макрометодом использовали полистироловые планшеты с вместимостью лунок 2 мл, микрометодом — планшеты круглодонные для иммуноферментного анализа однократного применения с вместимостью лунок 0,2 мл.

Постановку РАЛ микрометодом проводили следующим образом: в 8 рядов полистиролового планшета вносили дозаторами по 0,05 мл разводящей жидкости — белковый стабилизатор. Дозатором в первые лунки 3 рядов добавляли взвеси гомологичных штаммов в концентрации 5×10^7 м.к./мл по 0,05 мл. Делали последовательные двукратные разведения переносом по 0,05 мл из одной лунки в другую по 7-ю лунку включительно. Из последних лунок по 0,05 мл удаляли. Для контроля диагностикума использовали 8-е лунки. Затем во все лунки добавляли по 0,025 мл диагностикума латексного иммуноглобулинового 0,2% концентрации. Содержимое планшета осторожно встряхивали до получения однородной суспензии, оставляли при комнатной температуре на 2,5 ч. Постановку реакции при контроле специфичности проводили аналогично, используя вышеуказанные штаммы гетерологичных микроорганизмов.

Учет результатов осуществлялся так: по феноменам «зонтик», «пуговка» реакцию предварительно учитывали через 2,5 ч, а окончательно — через 24 ч. Результат РАЛ считали положительным при выпадении полиакролеиновых микросфер на дно лунок равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее $2/3$ диаметра сферической поверхности дна лунки. При отрицательном результате полиакролеиновые микросферы выпадали на дно лунки в виде «пуговки» или узкого колечка с ровным краем. В контрольных лунках результат отрицательный.

РНГА (микрометод) ставили аналогично РАЛ, при использовании в качестве разводящей жидкости (твин 80 в разведении 1:50000). При постановке реакции вносили диагностикум эритроцитарный иммуноглобулиновый 0,5% концентрации. Учет результатов проводился аналогично РАЛ.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью критерия Стьюдента, использовали программу Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Таким образом, сравнивая биотехнологию получения эритроцитарных и латексных диагностикумов, необходимо отметить, что при производстве латексных диагностикумов сокращаются материальные и трудовые затраты.

Контроль специфической активности и специфичности проводили в лабораторных условиях макро- и микрометодами в РНГА и РАЛ с применением тест-штаммов из рабочей коллекции патогенных микроорганизмов. В качестве исследуемого материала были взяты пробы чистых культур микроорганизмов (бактериальные суспензии: 3 штамма *F. tularensis* в концентрации $2,0 \times 10^7$ м.к./мл и 6 штаммов гетерологичных микроорганизмов в концентрации $4,0 \times 10^8$ м.к./мл).

Воспроизводимость метода оценивали одновременно четыре специалиста разных лабораторий института.

Результаты контроля чувствительности и специфичности диагностикумов туляремийных иммуноглобулиновых латексных и эритроцитарных (жидких и лиофилизатов) в РНГА и РАЛ составили $7,8 \times 10^5$ – $1,56 \times 10^6$ м.к./мл ($t=1$) и выше, что полностью удовлетворяет требованиям нормативной документации. Препараты специфичны и не дают перекрестных реакций со штаммами гетерологичных микроорганизмов (табл. 1).

Проведенные исследования указывают на то, что чувствительность и специфичность туляремийного полиакролеинового диагностикума не уступают по аналогичным показателям эритроцитарному диагностикуму при постановке РНГА.

Экспериментально доказано, что в течение всего срока испытания эритроцитарные и латексные диагностикумы (в масштабе реального времени) сохраняли стабильность без изменения внешнего вида, рН, специфичности и специфической активности. В течение 12 месяцев наблюдения качественные показатели препарата оставались в пределах установленных интервалов при температуре хранения от 2 до 8 °С. В процессе применения восстановленный препарат характеризуется стабильностью своих биологических и физико-химических свойств в течение 1 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

**Контроль специфической активности и специфичности иммуноглобулиновых диагностикумов
— эритроцитарных и латексных (выборочно)**

№	Штаммы	Диагностикумы			
		Эритроцитарные		Латексные	
		I комплект	II комплект	I комплект	II комплект
		Концентрация взвеси, м.к./мл			
1	<i>F. tularensis</i> Schu	$7,8 \times 10^5$	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$
2	<i>F. tularensis</i> Miura	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$1,56 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$
3	<i>F. tularensis</i> 890	$1,56 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$	$1,56 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$
4	<i>B. abortus</i> 544	Отрицательные результаты			
5	<i>B. melitensis</i> 16-M				
6	<i>B. suis</i> 133O				
7	<i>Y. enterocolitica</i> 64				
8	<i>Y. enterocolitica</i> 178				
9	<i>Y. enterocolitica</i> 383				
10	Контроль диагностикума	Агглютинация отсутствует			

Заключение

В итоге выполнения работы проведен сравнительный анализ биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов и методов РНГА и РАЛ. К преимуществам латексного диагностикума можно отнести использование в качестве твердой матрицы стабильного в физическом и химическом отношении активированного полимера с постоянными характеристиками, а также сокращение материальных и трудовых затрат при его производстве. Следовательно, препараты, изготовленные на его основе, могут с успехом дополнять или заменять эритроцитарные диагностикумы при проведении рутинных исследований, направленных на выявление возбудителя туляремии или детекцию его антигенов.

Сложности и продолжительность постановки реакции с полученными диагностикумами для РАЛ и РНГА исследовали при определении патогенных агентов (*F. tularensis*) — установлена их идентичность.

Достоинства методов РНГА и РАЛ: высокая специфичность и чувствительность; простота постановки; минимальное количество компонентов; низкая стоимость; визуальный учет (нет необходимости в дорогостоящем оборудовании и ингредиентах); экспрессность при исследовании микрометодом (2–2,5 ч).

Литература

1. *Жарникова И.В., Курчева С.А., Жарникова Т.В., Жданова Е.В., Кальной С.М.* Сравнительная характеристика

методов диагностики возбудителей туляремии и бруцеллеза // Технологии живых систем. — 2015. — Т. 12. — № 1. — С. 41–49.

- Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Зайцев А.А., Жарникова Т.В., Левченко Н.В., Кочарян А.С.* Способ получения раствора, используемого в качестве разводящей жидкости и среды высушивания эритроцитарных и латексных диагностикумов. Патент на изобретение № 2395094. Оpubл. 20.07.10 г. Бюл. № 20.
- Правила надлежащей лабораторной практики (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. N 199н) [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://minjust.consultant.ru/documents/20332?items=1&page=2>.
- СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.
- СП 1.3.3118-13 Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности).
- Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Коготкова О.И., Кальной С.М., Куличенко А.Н.* Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителя // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. — 2015. — № 4(56). — С. 21–26.
- Burnett M.W.* Tularemia // J. Spec. Oper. Med. — 2016. — Vol. 16 (4). — P. 71–73.
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union, L 276, 20 October 2010.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF BIOTECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF ERYTHROCYTE AND LATEX DIAGNOSTICUMS TO IDENTIFY THE CAUSATIVE AGENT OF TULAREMIA

I.V. ZHARNIKOVA, E.V. ZHDANOVA, T.V. ZHARNIKOVA, O.L. STARTSEVA,
S.A. KURCHEVA, A.S. GEOGJAYAN, A.A. SEMIRCHEVA, A.G. KOSHKIDKO, Yu.Yu. GARCUSHA

Stavropol Antiplague Institute of Rosпотребнадзор, Stavropol

A comparative analysis of the biotechnology of obtaining erythrocyte and latex immunoglobulin diagnostics and methods for identifying the causative agent of tularemia based on the indirect hemagglutination reaction (IHR) and latex agglutination reaction (LAR) was carried out. The chemical properties of latex microcarriers are relatively constant and lend themselves to a lighter and more accurate characterization compared to the surface properties of the outer membrane of red blood cells, which vary widely depending on conditions such as gender, age, hormonal status of the producer animal and time of blood collection. Pretreatment methods also have a significant impact on the stability of red blood cell diagnostics. To obtain stable erythrocyte diagnostics, the method of formalin treatment and activation of erythrocytes was experimentally selected. Latex microcarriers do not need preliminary preparation and may have prospects of use in conditions not involving the use of instrumental accounting. Studies of comparison of IHR and LAR indicate that the sensitivity ($7.8 \times 10^5 - 1.56 \times 10^6$ m.k./ml ($t=1$) and higher) and specificity (the absence of cross-reactions with heterologous strains) reaction agglutination of latex with prepared tularemia polyacrolein diagnosticum is not inferior in terms of these indicators to IHR with erythrocytic diagnosticum.

Keywords: ram erythrocytes, latex, immobilization, tularemia microbe strains, indirect hemagglutination reaction (IHR), latex agglutination reaction (LAR).

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ МИКРОБОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА 15 НИИЭГ

Д.Н. БИБИКОВ¹, А.В. КОМИССАРОВ^{1,2*}, О.А. ВОЛОХ¹, Е.М. КУЗНЕЦОВА¹,
С.А. БАДАРИН¹, Н.Г. АВДЕЕВА¹, Ю.И. САМОХВАЛОВА¹, А.К. НИКИФОРОВ^{1,2}

¹ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,

²Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов

Экспериментально обоснована возможность производства новой формы выпуска туляреминой вакцины — лиофилизат во флаконах. Разработан новый состав среды высушивания клеток туляреминого микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Определены оптимальные параметры лиофилизации. Исследованы спецификационные характеристики туляреминой вакцины. Установлено, что экспериментально обоснованные методические приемы лиофилизации позволяют получать готовую лекарственную форму туляреминой вакцины, соответствующую требованиям нормативной документации.

Ключевые слова: живая туляреминая вакцина, сублимационное высушивание, среда высушивания, лиофилизат во флаконах.

Введение

Вакцинация против туляремии в 2011 году Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ (№ 51н от 31 января 2011 г.) включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям, предусматривающий проведение специфической профилактики для населения, проживающего на энзоотичных по туляремии территориях, а также прибывших на эти территории лиц, выполняющих ряд работ.

Единственным зарегистрированным в России средством специфической профилактики туляремии служит вакцина туляреминая живая сухая, основным компонентом которой являются клетки туляреминого микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ. Технология производства данного иммунобиологического лекарственного препарата предусматривает: получение посевных культур I, II и III генерации штамма *Francisella*

tularensis 15 НИИЭГ; осуществление процесса накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации; последующий розлив, замораживание, сублимационное высушивание; герметизацию и упаковку препарата. Готовая лекарственная форма вакцины представляет собой биофармацевтическую композицию, которая содержит (состав приведен на 1 мл): активный компонент: клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ — 20 ± 10 млрд клеток; и вспомогательные вещества: сахара — 0,099 г; натрия глутамата моногидрат — 0,1485 г; тиомочевина — 0,0495 г; желатин — 0,099 г [1].

Технология производства живой туляреминой вакцины предусматривает получение биомассы на полужидких питательных средах в культуральных флаконах с аэрацией [9]. Выращивание культуры проводят глубинным методом. Аэрацию осуществляют либо непрерывным пропусканием через толщу среды мелкораспыленного воздуха [6], либо непрерывным встряхиванием [11]. Эффективность полужидких сред, применяемых для производства вакцины невелика, после 18 ч выращивания концентрация микроорганизмов увеличивается всего в 5–6 раз [6, 9].

Отсутствие стадии концентрирования туляреминого микроба в технологии ее производства обладает рядом отрицательных моментов:

- потенциальность выбраковки биомассы после процесса ее накопления в случае недостаточной для приготовления готовой лекарственной формы концентрации микроорганизма;

© 2019 г. Бибиков Д.Н., Комиссаров А.В., Волох О.А., Кузнецова Е.М., Бадарин С.А., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

Комиссаров Александр Владимирович
д.б.н., доцент, главный научный сотрудник, ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»; профессор кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

E-mail: Komissarov-9@yandex.ru

- возможная повышенная реактогенность вакцины из-за наличия питательной среды в готовой лекарственной форме.

Названные недостатки устранены способом получения концентрата микробных клеток для получения живой туляремийной вакцины, изложенным в патенте РФ 2528878, который характеризуется тем, что туляремийный микроб выращивают на питательной среде, содержащей, г/л: сухой ферментативный гидролизат фибрина, приготовленный из отхода производства антирабического иммуноглобулина, — 50–55, глюкозу — 10, пантотенат кальция — 0,05, содержание аминного азота — не менее 320 мг%, при температуре 37 °С в течение 20±2 часов с последующим концентрированием микробной массы путем микрофльтрации культуры туляремийного микроба через мембраны с размером пор 0,2 мкм в режиме тангенциального потока жидкости [3].

Однако после лиофилизации биофармацевтической композиции, с составом среды высушивания аналогичным вышеназванным, происходило снижение показателя «Процент живых микробных клеток», в среднем, на 30%, что может быть связано с неоптимальным составом среды высушивания и условиями сушки препарата, а также запайки ампул (без вакуума) [2]. Кроме того, показатель «Термостабильность» не соответствовал требованиям нормативной документации.

Применяемая на данный момент технология сублимационного высушивания вакцины включает в себя, в том числе, осуществление следующих технологических процедур:

- замораживание разлитого в ампулы препарата в низкотемпературном холодильнике;
- перенос замороженного материала на полки сублимационной установки;
- непосредственно лиофилизация;
- герметизация ампул их запаиванием с использованием горючих газов (пропана, бутана, кислорода).

Во время осуществления названных операций существует вероятность возникновения ситуаций, ухудшающих качество готового препарата. Так, во время переноса замороженного материала на полки сублимационной установки может произойти его частичное оттаивание, приводящее к развитию «коллапса» и ухудшению свойств вакцины. При выгрузке ампул после лиофилизации и в процессе их запаивания имеется вероятность контаминации воздушной микрофлорой препарата.

Использование горючих газов для запайки ампул, в случае их неконтролируемого выхода в производствен-

ные помещения, не исключает возможность отравления персонала и взрыва.

Исключить возникновение подобных ситуаций представляется возможным разработкой технологии сублимационного высушивания туляремийной вакцины во флаконах на лиофилизаторах, позволяющих проводить операции замораживания и сушки препарата, а также герметизации первичной упаковки непосредственно в камере оборудования. При этом следует отметить, что в последнее время в качестве первичной упаковки лиофилизированных лекарственных и диагностических препаратов предпочтение отдается флаконам [5, 8].

Таким образом, проблема разработки технологии лиофилизации микробов туляремийного вакцинного штамма 15 НИИЭГ с целью получения готовой лекарственной формы туляремийной вакцины является актуальной.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ и тест-заражающий природный штамм *F. tularensis* ssp. *holarctica* 503/840 (выделен от клещей в 1949 г.), которые были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, Россия). Культуры *F. tularensis* на этапах подготовки и анализа их свойств выращивали на плотной питательной среде FT-агар (ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) при температуре 37 °С в течение 48 часов. Стандартные суспензии клеток штаммов *F. tularensis* готовили в стерильном 0,9%-ном растворе натрия хлорида с использованием ОСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, что эквивалентно 5×10^9 м.к./мл.

Проводили сублимационное высушивание культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенной методом глубинного культивирования в течение 22 ± 1 ч при температуре $37 \pm 0,5$ °С в жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата фибрина (рН $7,2 \pm 1$) и подвергнутой концентрированию тангенциальной микрофльтрацией на микрофльтрационной установке Vivaflow 200 (Sartorius, Германия) через мембраны с размером пор 0,2 мкм [5]. Культуру смешивали со средой высушивания, разливали по флаконам и ампулам и подвергали сублимационному высушиванию в сушильной установке Epsilon 2–6D (Martin Christ, Германия).

Полученные лиофилизаты анализировали по следующим показателям: подлинность, время растворения, рН, время седиментационной устойчивости, размер

частиц, потеря в массе при высушивании (остаточная влажность), точность розлива, наличие вакуума в первичной упаковке, отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов, специфическая безопасность, концентрация микробных клеток, жизнеспособность (процент живых микробных клеток), степень диссоциации, прививаемость, иммуногенность, термостабильность. Применяли методы, изложенные в Фармакопейной статье на вакцину туляремию живую [1].

Для определения подлинности содержимое первичной упаковки с вакциной разводили водой для инъекций до первоначального объема, затем взвесы разводили в 10 раз 0,9% раствором натрия хлорида, готовили мазки и окрашивали иммуноглобулинами флуоресцирующими туляремиными сухими (ФСП 42-0180-5316-04) в соответствии с инструкцией по их применению. Если в мазках из препарата микробные клетки светились по периферии ярко-зеленым цветом, то считали, что культура вакцинного штамма туляремию микроба является чистой.

Время растворения устанавливали визуально, для чего добавляли в первичную упаковку воду для инъекций до первоначального объема. Если препарат полностью растворялся при встряхивании в течение 3 мин и в растворенном виде представлял собой гомогенную мутную суспензию желтовато-белого цвета без посторонних примесей, осадка или хлопьев, то его считали прошедшим испытания.

рН определяли потенциометрически с использованием измерителя рН/ОВП/концентрации ионов/проводимости/концентрации РК SevenExcellence-475 Mettler Toledo (Pharmacia LKB Biotechnology, Швеция). Нормируемое значение составляло $7,2 \pm 0,2$.

Время седиментационной устойчивости устанавливали визуально, для чего добавляли в первичную упаковку воду для инъекций до первоначального объема, встряхивали в течение 3 мин. Если суспензия вакцины, образующаяся при встряхивании, не расслаивалась в течение 5 мин, то препарат считали прошедшим испытания.

Показатель «размер частиц» считали соответствующим требованиям нормативной документации, если суспензия вакцины, полученная после растворения лиофилизата препарата в воде для инъекций, свободно проходила в шприц через иглу № 0840.

Остаточную влажность препаратов определяли из пяти первичных упаковок с использованием влагомера Sartorius MA 150 (Sartorius, Германия). Нормируемое значение составляет не более 4%.

Точность розлива определяли по коэффициенту вариации массы вакцины в первичной упаковке, который

должен быть не более 5%. Определение проводили весовым методом. 10 образцов без этикеток обрабатывали смесью спирта с эфиром и помещали в эксикатор на 3 ч. Первичные упаковки вскрывали, взвешивали вместе с препаратом, затем удаляли содержимое и промывали водой. После этого первичные упаковки выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С до постоянной массы. По разности масс первичных упаковок с содержимым и без него находили массу вещества и рассчитывали коэффициент вариации (V) в процентах по формуле (1):

$$V = \frac{S \times 100}{\bar{x}} \quad S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (1)$$

где S — стандартное отклонение;

\bar{x} — среднее арифметическое значение массы

вещества в ампуле;

X — масса вещества в каждой ампуле;

n — число первичных упаковок.

Наличие вакуума в первичной упаковке определяли визуально по цвету свечения газовой среды (определение цвета свечения газовой среды ампул с препаратом при возбуждении ее высокочастотным электрическим полем с помощью аппарата типа д'Арсонваль). Если газовая среда давала бледно-голубое свечение, то препарат считали прошедшим испытания.

Концентрацию микробных клеток измеряли по отраслевому стандартному образцу мутности — ОСО мутности 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздравсоцразвития России, эквивалентной концентрации 5 млрд. кл. мл⁻¹, с учетом разведения пробы. Для расчета общей концентрации (ОК) использовали формулу (2):

$$OK = \frac{(0,5 + V) \times 5 \times 10^9}{0,5}, \quad (2)$$

где V — объем 0,9% раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл;

0,5 — объем испытуемого образца, мл;

5×10^9 — эквивалент туляремию микроба, соответствующий стандарту мутности (10 МЕ), м.к./мл.

Жизнеспособность (процент живых микробных клеток) определяли высевом на пластинки с FT агаром, учет проводили через 5 сут выдерживания посевов при температуре 37 ± 1 °С. Из полученных проб (образцов) делали последовательные десятикратные разведения до 10^{-7} , из которых по 0,1 мл взвеси отдельно для каждого образца высевали на 3 чашки Петри с питательной сре-

дой. За количество живых микробных клеток принимали среднее арифметическое определений количества выросших колоний в трех образцах. Нормируемое значение составляет не менее 40%. Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.) рассчитывали по формуле (3):

$$\% \text{ живых м.к.} = \frac{БК}{ОК} \times 100\%, \quad (3)$$

где БК — количество живых м.к. в 1 мл;

ОК — общая концентрация м.к.

Степень диссоциации культуры определяли по числу SR (белых) колоний от общего количества выросших колоний. После инкубации чашек Петри в термостате при температуре $37 \pm 1^\circ \text{C}$ в течение 5 сут их помещали на 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8°C . После этого подсчитывали число иммуногенных «белых» и неиммуногенных «серых» колоний и вычисляли их процентное соотношение. Нормируемое значение SR (белых) колоний составляет не менее 80%.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов в препаратах вакцины обеспечивали высевами на тиогликолевую среду. Через 14 сут выращивания из всех пробирок с посевами и пересевами готовили мазки, окрашивали их по Граму и микроскопировали при увеличении $K7 \times 40$. В случае обнаружения хотя бы в одном из 10 просмотренных полей зрения кокков или грамположительных палочек — этот образец считали загрязненным посторонней микрофлорой.

Для определения специфической безопасности препарат растворяли в 1 мл воды для инъекций, затем 0,9%-ным раствором хлористого натрия доводили до концентрации 5×10^9 м.к./мл по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85П 10 единиц и по 0,2 мл вводили подкожно десяти морским свинкам массой 475 ± 25 г. Вакцина не должна вызывать гибели животных в течение 15 сут наблюдения. В месте введения возможно транзиторное воспаление кожи и подкожной клетчатки. В случае если животные оставались живыми или наступала гибель одной морской свинки в течение 15 сут, то препарат считали безвредным.

Прививаемость. Вакцина в дозе 2×10^7 живых м.к. при накожной иммунизации морских свинок должна вызывать через 2–5 сут реакцию в виде инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм вокруг насечек. Содержимое одной первичной упаковки разводили водой для инъекций в объеме, который рассчитан для накожного применения данной серии вакцины (0,1 мл на 1 накожную дозу). Далее микробную взвесь разводили

в 10 раз 0,9%-ным раствором натрия хлорида до концентрации 2×10^8 живых м.к./мл и прививали накожно в объеме 0,1 мл трех морских свинок массой 400 ± 25 г. На участок депилированной кожи, предварительно обработанной спиртом и эфиром, после испарения эфира наносили пипеткой 2 капли микробной взвеси на расстоянии 20–30 мм одну за другой. Через каждую каплю оспопрививательным пером делали по две параллельные некровотокающие насечки длиной 8–12 мм. Нанесенную на кожу взвесь тщательно втирали в течение 1 мин плоской стороной пера.

Иммуногенность. При накожной иммунизации морских свинок дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл не менее 8 из 10 животных должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dosis certe letalis (Dcl) тест-заражающего штамма туляремиального микроба, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к. Для определения иммуногенности 10 морских свинок массой 350 ± 50 г иммунизировали дозой 2×10^7 живых м.к. в объеме 0,1 мл накожно по методике, изложенной для показателя «Прививаемость». Заражение животных проводили через 25–30 сут после иммунизации дозой, равной 1000 Dcl. Наблюдение за зараженными животными вели в течение 30 сут. Все контрольные животные должны погибнуть от туляремии в срок до 15 сут при типичных патологоанатомических изменениях (плотный инфильтрат в месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение селезенки и печени). Всех павших животных вскрывали, органы и ткани подвергали бактериологическому исследованию, высевая их методом отпечатков на чашки с FT-агаром.

Термостабильность. Не менее 7 сут. Определение проводили через 14 сут хранения 6 ампул при температуре $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Определяли в трех образцах (для каждого объединяли содержимое двух первичных упаковок). Показатель термостабильности рассчитывали по формуле (4):

$$t = \frac{0,3 \times 14}{\lg A_0 - \lg A_n}, \quad (4)$$

где t — показатель термостабильности в сут;
 $\lg A_0$ — логарифм первоначального числа живых м.к./мл;

$\lg A_n$ — логарифм числа живых м.к./мл через 14 сут хранения вакцины при температуре $37 \pm 1^\circ \text{C}$;

0,3 — постоянная величина;

14 — срок хранения вакцины при температуре $37 \pm 1^\circ \text{C}$ в сут.

Температуру замерзания и эвтектические температуры определяли методом определения удельного электрического сопротивления, разработанным L. Rey [12]. Метод основан на параллельном замере температуры материала и величины удельного электрического сопротивления исследуемого объекта при его замораживании.

Остальные методические приемы описаны в результатах исследований.

Результаты и обсуждение

На первоначальном этапе исследований осуществляли подбор защитных сред высушивания. Полуфабрикат вакцины, состоящий из концентрата штамм *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, разводили до необходимой концентрации микробных клеток средой высушивания на основе 25 мМ калий-фосфатного буфера pH 8,0±0,2 таким образом, чтобы в 1 мл полученной суспензии было 20±10 млрд клеток туляремийного микроба и вспомогательных веществ с количеством, представленным в таблице 1. Препарат разливали по 1 мл в стеклянные флаконы вместимостью 10 мл. В качестве контроля применяли существующий биофармацевтический состав вакцины в количестве 1 мл, разлитый в ампулы вместимостью 5 мл.

Таблица 1

Варианты защитных сред высушивания

Номер варианта	Состав среды высушивания, г		
	трегалоза	декстран	агар-агар
1	0,3	0,0002	0,0025
2	0,3		отсутствует
3	0,1		0,0025
4	0,1		отсутствует
5	0,3		0,005

Примечание: Основа защитных сред высушивания – 25 мМ калий-фосфатный буфер, pH 8,0

По окончании розлива флаконы и ампулы с препаратом устанавливали на полки сублимационной сушильной установки Epsilon 2–6D, замораживали материал до температуры минус 40 °С и выдерживали в течение 2 ч. Конденсатор-вымораживатель охлаждали до температуры минус 65±5 °С. Во флаконы вставляли специальные пробки для лиофилизации таким образом, чтобы боковые прорезы в пробках не перекрывались полностью горлышком флакона. Затем создавали остаточное давление в сушильной установке 0,1±0,01 мбар. Процесс сублимации вели от температуры полок минус 40±5 до 30±2 °С со скоростью повышения температуры полок не

более 5 °С в час. Названные температурно-временные режимы замораживания и лиофилизации позволили в течение всего технологического процесса высушивания поддерживать параметр LyoRx, измеряемый в контроле и характеризующий электрическое сопротивление материала в пределах 96–97%, что, по результатам наших предыдущих исследований по совершенствованию процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины, является оптимальным [7]. При достижении температуры материала 25±2 °С флаконы герметизировали непосредственно в камере сушильной установки, используя винтовой прижиматель пробок, являющийся конструктивным элементом сушильной установки. После герметизации флаконов давление в установке выравняли с атмосферным и проводили выгрузку флаконов и обкатку их алюминиевыми колпачками.

Предлагаемый график высушивания представлен на рисунке 1.

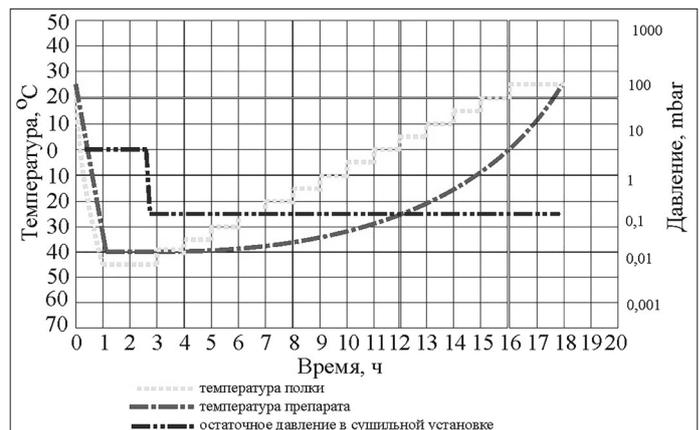


Рис. 1. График высушивания туляремийной живой вакцины

Полученные лиофилизаты контролировали по следующим показателям: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, pH, седиментационная устойчивость. Кроме того, флаконы проверяли на наличие вакуума. Контрольный препарат соответствовал всем требованиям. Во всех флаконах имелся вакуум, значения pH и остаточной влажности находились в нормируемых пределах. В препарате с вариантом защитной среды № 2 произошло «вспенивание» препарата и, соответственно, он был отбракован по показателю «внешний вид». Лиофилизаты с вариантом среды высушивания № 1 и 5 не прошли испытания по показателям «растворимость» и «седиментационная устойчивость», что, по нашему мнению, связано с избыточным содержанием в составе среды высушивания трегалозы и агар-агара. У препара-

тов № 3 и 4 зафиксировано уменьшение объема таблетки лиофилизата и отслоение ее от стенок флакона (рис. 2). Нами было высказано предположение о том, что данный эффект может наблюдаться по следующим причинам: недостаточные высота высушиваемого материала и (или) количество декстрана. Положительным итогом данного этапа исследований являлась успешная попытка герметизации флаконов непосредственно в камере лиофилизатора с сохранением вакуума в первичной упаковке.



Рис. 2. Внешний вид препаратов № 3 и 4

На дальнейшем этапе исследований мы применили следующие варианты сред высушивания, представленные в таблице 2. Отличиями методических подходов данного шага исследований были: в 1 мл суспензии было 10 ± 5 млрд клеток туляремийного микроба, препарат разливали по 2 мл во флаконы. Кроме того, была предпринята попытка использования нового компонента среды высушивания — хитозана.

Таблица 2

Варианты защитных сред высушивания

Номер варианта	Состав среды высушивания, г			
	трегалоза	декстран	агар-агар	хитозан
А	0,1	0,0002	0,0025	отсутствует
В	0,1	0,0002	отсутствует	отсутствует
С	0,1	0,01	0,0025	отсутствует
Д	0,1	0,02	отсутствует	отсутствует
Е	0,1	0,01	отсутствует	0,02

Примечание: Основа защитных сред высушивания — 25 мМ калий-фосфатный буфер, рН 8,0

Характеристики полученных лиофилизатов (внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, рН, седиментационная устойчивость, наличие вакуума) соответствовали нормируемым требованиям. У препарата В зафиксировано уменьшение объема таблетки лиофилизата и отслоение ее от стенок флакона. В препарате Е показатель «растворимость» обладал более лучшими значениями — 20 секунд. У других лиофилизатов он лежал в пределах от 90

до 150 секунд. Кроме того, в препарате Е не зафиксировано расслоения в течение более 1 часа (время наблюдения). У других образцов данный эффект наблюдался в промежуток времени от 10 до 30 мин. Основываясь на полученных результатах, мы отдали предпочтение следующей биофармацевтической композиции (состав приведен на 1 мл): клетки штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ — 10 ± 5 млрд клеток; вспомогательные вещества: трегалоза — 0,1 г; декстран — 0,01 г; хитозан — 0,02 г. В этом случае показатели специфической активности препарата в лиофилизированном состоянии не отличались от препарата в жидкой форме и составляли: по показателю «концентрация» — $1,2 \times 10^{10}$ м.к./мл, «процент живых микробных клеток» — 74%, «степень диссоциации» — 98% (в жидкой форме $1,1 \times 10^{10}$ м.к./мл, 73 и 98%, соответственно).

В технологии лиофилизации препаратов первой процедурой является его замораживание, от правильного проведения которого зависит качество готового продукта. Основными характеристиками, позволяющими оценить рациональные температурные режимы процедур замораживания и последующей сублимации, являются температуры полного замерзания, а также нижняя и верхняя эвтектическая температуры [9].

Для определения названных свойств живой туляремийной вакцины использовали метод, предложенный L. Rey [12], основанный на параллельном измерении температур материала и его электрического сопротивления при замораживании-оттаивании образца. Замораживание-оттаивание осуществляли в установке Epsilon 2–6D, где электрическое сопротивление измеряется датчиком LyoRx, показания которого выводятся на вторичный прибор в процентах.

Результаты определения температурных характеристик туляремийной вакцины представлены на рисунке 3.

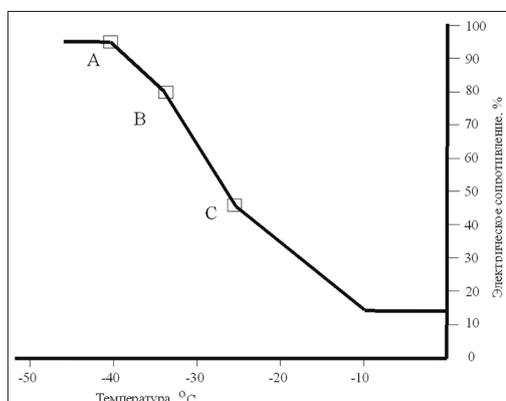


Рис. 3. График зависимости величины электрического сопротивления от температуры живой туляремийной вакцины

Анализ данных рисунка 3 показывает, что значения определяемых характеристик являются следующими: температура полного замерзания — минус 40 °С (точка А), нижняя и верхняя эвтектическая температуры — минус 35 °С (точка В) и минус 25 °С (точка С) соответственно.

В практическом плане знание этих температур позволяет сделать вывод о целесообразности замораживания препарата до минус 40–45 °С (на 5–10 °С ниже значения нижней эвтектической температуры, как рекомендовано рядом исследователей [4, 12]), а также проведения процесса первичной сублимации при значениях температуры, лежащих в интервале от минус 35 °С до минус 25 °С.

По предложенным методическим приемам лиофилизации получены экспериментально-производственные серии туляремийной вакцины и исследованы ее нормируемые показатели. Для сравнения вакцину с подобранным биофармацевтическим составом *t* разливали по 2 мл в стеклянные флаконы вместимостью 10 мл и в ампулы вместимостью 5 мл в количестве 1 мл. Спецификация полученных форм вакцины по нормируемым показателям сразу после сушки и спустя 2 года после хранения при 4 °С представлена в таблице 3. Из анализа полученных данных следует, что флаконы с лиофилизатом полностью соответствуют предъявляемым требованиям независимо от срока хранения, в то время как вакцина в ампулах не отвечала требованиям жизнеспособности и термостабильности.

Таблица 3

Спецификация экспериментальных серий живой туляремийной вакцины, полученной по усовершенствованной технологии (результаты объединенной пробы из трех флаконов (ампул))

Показатели	Первичная упаковка, срок хранения			
	Флакон, 0 ч хранения	Ампула, 0 ч хранения	Флакон, 2 года хранения при 4 °С	Ампула, 2 года хранения при 4 °С
Описание	пористая масса светло-желтого цвета	пористая масса светло-желтого цвета	пористая масса светло-желтого цвета	пористая масса светло-желтого цвета
Время растворения	2–3 сек.	2–3 сек.	2–3 сек.	2–3 сек.
рН	6,83	6,85	6,87	6,83
Время седиментационной устойчивости	>5 мин.	>5 мин.	>5 мин.	>5 мин.
Размер частиц	свободно	свободно	свободно	свободно
Специфическая активность:				
1. Концентрация микробных клеток	1,2×10 ¹⁰	1,7×10 ¹⁰	1,2×10 ¹⁰	1,7×10 ¹⁰
2. Процент живых м.к.	52%	31%	41%	17%
3. Степень диссоциации	89% SR колоний	87% SR колоний	90% SR колоний	89% SR колоний
Термостабильность	8 сут	4,5 сут	7 сут	не проверяли

Для оценки иммуногенности, прививаемости и специфической безопасности на морских свинках была выбрана экспериментальная серия живой туляремийной вакцины, лиофилированная во флаконах. О специфической безопасности вакцины судили по 100%-ной выживаемости морских свинок в течение всего срока наблюдения после введения 0,2 мл вакцины в концентрации 5×10⁹ м.к./мл. Осмотр места введения также показал незначительную гиперемию на 2–3-е сутки (допустимая местная реакция), которая не регистрировалась к 7 суткам. Гибели животных во всех исследуемых группах не происходило. При подкожной вакцинации морских свинок дозой 2×10⁷ живых м.к. через 2–5 сут. на коже у животных наблюдалась реакция в виде инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 10 мм вокруг насечки.

При последующем подкожном заражении через 29 суток на кожу вакцинированных морских свинок тест-заражающим штаммом *F. tularensis* 503/840 в дозе 5000 м.к. (1 Dcl=5 м.к.) все животные выжили (срок наблюдения 30 сут.), тогда как группа контрольных животных пала на 11-е сутки. Проводили вскрытие павших и выживших животных с высевом методом отпечатков на FT-агар. Патологоанатомическая картина павших животных была характерной для туляремийной инфекции (плотный инфильтрат в месте введения, гиперемия сосудов подкожной клетчатки и паховых лимфатических узлов, увеличение и уплотнение печени и селезенки). В посевах от павших животных был отмечен рост туляремийного микроба, в посевах от выживших специфического роста не наблюдалось.

Представляло определенный научно-практический интерес изучение влияния продолжительности замораживания на качество лиофилизатов туляремийной вакцины. Флаконы с препаратом замораживали до температуры материала минус 40 ± 5 °С на полках сублимационной сушильной установки. При этой температуре материал выдерживали в течение следующих промежутков времени: 2–3 ч, 5–6 ч, 10–11 ч, 15–16 ч, 23–24 ч.

Далее высушивали в соответствии с технологическими приемами, описанными ранее.

Оценку влияния времени замораживания на качество лиофилизатов проводили по следующим показателям: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, рН, седиментационная устойчивость, жизнеспособность.

Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты исследований влияния времени замораживания на качество лиофилизатов

Время замораживания, ч	Остаточная влажность, %		Растворимость, секунд		рН		Седиментационная устойчивость, мин		Жизнеспособность, %	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
2–3	н/о	0,8	н/о	30	6,9	7,0	н/о	более 60	62	60
5–6		0,8		35	7,0	7,1			58	55
10–11		1,1		25	7,1	7,1			69	69
15–16		1,0		30	6,9	6,9			54	53
23–24		0,9		30	7,0	7,0			70	68

Примечание: I – значение показателя жидкого препарата, II – значение показателя лиофилизата, н/о – не определяли

По внешнему виду полученные лиофилизаты представляли собой сухую массу желтовато-белого цвета в виде хорошо сформированной таблетки. Остаточная влажность для препаратов была практически одинаковой и составляла от 0,8 до 1,1%. Значение рН растворов, полученных после растворения лиофилизатов, было от 6,8 до 6,9. Полученные лиофилизаты легко растворялись в 1 мл воды в течение 2–3 секунд. Расслаивание препаратов в течение более 60 мин обнаружить не удалось. Жизнеспособность образцов после их лиофилизации практически не менялась в сравнении с жидкими препаратами. Значения всех показателей соответствовали нормируемым требованиям. Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод об одинаковом влиянии времени замораживания на показатели лиофилизатов. В практическом плане это дает возможность варьировать временем начала сублимационного высушивания.

Заключение

В результате проведенных исследований усовершенствована технология лиофилизации клеток туляремийного микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ, позволяющая получать новую форму выпуска туляремийной вакцины – лиофилизат во флаконах, соответствующую требованиям нормативной документации.

Литература

1. Вакцина туляремийная живая. Фармакопейная статья ФС.3.3.1.0019.15/ Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том IV). – М.: ФЭМБ. 2018. – С. 5317–5325.
2. Волох О.А., Комиссаров А.В., Антонычева М.В., Лобовикова О.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Миронова Н.П., Бибииков Д.Н., Никифоров А.К. Совершенствование технологии получения живой туляремийной вакцины / Проблемы особо опасных инф. – 2016. – Вып. 3. – С. 81–84.
3. Волох О.А., Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г. Патент РФ 2528878, 2014.
4. Гусаров Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) // Биофармацевтический журнал. – 2010. – Т. 2(5). – С. 3–7.
5. Жученко М.А., Пашкова М.А., Потапенко О.В. Лиофилизация препаратов в двухкамерных шприцах // Биотехнология. – 2015. – № 4. – С. 79–84.
6. Колядицкая Л.С., Шмурыгина А.А. Усовершенствование препарата сухой живой туляремийной вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1957. – № 10. – С. 84–89.
7. Комиссаров А.В., Кочкалова Н.Н., Синицына Н.В., Бадарин С.А., Костылева Н.И., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины // Проблемы особо опасных инф. – 2016. – Вып. 1. – С. 90–93.

8. Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Бадарин С.А., Бибииков Д.Н., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Плотников И.А. Экспериментальное обоснование новой формы выпуска холерных диагностических сывороток // Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора в г. Ростове-на-Дону «Холера и патогенные для человека вибрионы». — Ростов-на-Дону, 2016. — С. 193–196.
9. Нежута А.А., Сербис Е.С. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов / Биотехнология. — 2001. — № 6. — С. 59–67.
10. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. — М.: Медицина, 1975. — 190 с.
11. Татомир Л.Г. Материалы по изучению туляремийной вакцины, изготовленной методом встряхивания культур *B. tularensis*: автореф. дис. канд. мед. наук. — Одесса, 1963. — 16 с.
12. Rey L., May J.C. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. — London: Informa Healthcare, 2010. — 564 p.

LYOPHILIZATION OF MICROBES OF TULAREMIA VACCINE STRAIN 15 NIEG

D.N. BIBIKOV¹, A.V. KOMISSAROV^{1,2}, O.A. VOLOKH¹, E.M. KUZNETSOVA¹, S.A. BADARIN¹,
N.G. AVDEEVA¹, Yu.I. SAMOKHVALOVA¹, A.K. NIKIFOROV^{1,2}

¹ *Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»*,

² *N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Saratov*

The possibility of producing a new form of tularemia vaccine — lyophilizate in vials — was experimentally substantiated. A new composition of the medium for drying tularemia microbe cells of the vaccine strain 15 NIEG was developed. Optimal freeze-drying parameters were determined. The specification characteristics of tularemia vaccine were investigated. It was established that experimentally based methodological procedures for freeze-drying made it possible to obtain a finished dosage form of tularemia vaccine that meets the requirements of normative documentation.

Keywords: live tularemia vaccine, freeze drying, drying medium, lyophilizate in vials.

КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АНТИГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ ВНЕШНИХ МЕМБРАН ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

Е.М. КУЗНЕЦОВА*, С.В. БОРИСОВА, О.А. ВОЛОХ, А.К. НИКИФОРОВ

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

Дан обзор общих теоретических положений различных исследователей и экспериментального авторского вклада, что позволило разработать комплексный методический подход к выделению иммунобиологически активных антигенных компонентов внешних мембран туляремиального микроба с позиций особенностей химической и антигенной структуры клеток и участия определенных антигенных комплексов в процессах иммуно- и патогенеза. Представленный алгоритм анализа протективного антигенного комплекса (ПАК и ПАК-М) дает возможность охарактеризовать состав препаратов и может быть использован для анализа комплексных антигенов *F. tularensis* сложной химической природы. Разработанная и апробированная технология ступенчатой разборки клеток возбудителя туляремии на субклеточные фракции и компоненты позволяет осуществить практически безотходную переработку бактериальной массы с получением специфических антигенов и их компонентов, пригодных для конструирования высокоэффективных профилактических и диагностических препаратов.

Ключевые слова: туляремиальный микроб, иммунобиологически активные антигенные компоненты внешних мембран, комплексный метод, обзор.

Существование многочисленных стойких природных очагов туляремии на территории Российской Федерации определяет напряженность эпидемической ситуации в ряде административных территорий страны, где ежегодно регистрируются заболевания этой инфекцией (Кудрявцева Т.Ю. и др., 2019) [7]. На сегодняшний день наиболее актуальной проблемой остается разработка безопасной субъединичной вакцины, а также методов экспресс индикации возбудителя и ранней диагностики инфекции (Мокриевич А.Н. и др., 2019 [12]; Mansour A.A. et al., 2018 [43]; Yanes H. et al., 2018 [51]). У возбудителя туляремии липополисахарид (ЛПС) и белки внешней мембраны (ВМ) влияют на специфичность иммунного ответа макроорганизма, обладают уникальной полиэпитопной антигенной структурой и рассматриваются как основа для создания профилактических и диагностических препаратов (Huntley et al., 2007 [37]; Hickey A.J. et al., 2011 [36]; Kilmury S.L.N., Twine S., 2011 [40]; Post D.M.B. et al., 2017 [45]). Современные представления о строении

клетки *Francisella tularensis*, ее антигенном составе позволяют определить выбор рационального методического подхода к процессу выделения и очистки отдельных клеточных компонентов, необходимых для конструирования эффективных диагностических препаратов с заданными свойствами, а также подойти к решению вопроса создания химической туляремиальной вакцины, обладающей высокой протективной активностью и безвредностью.

Липополисахарид *F. tularensis* является одним из основных отличительных маркеров ВМ и определяет видовую серологическую специфичность туляремиального микроба. В лабораторной практике наибольшую популярность имеет метод водно-фенольной экстракции препарата ЛПС *F. tularensis* по методике, предложенной О. Westphal (1965) [50], с последующей его очисткой от примесей нуклеиновых кислот и белков ультрацентрифугированием, обработкой протеолитическими ферментами или аффинной хроматографией на иммобилизованном полимиксине В. Полученный подобными методами ЛПС туляремиального микроба успешно зарекомендовал себя как диагностически значимый антиген (Fulop M.J. et al., 1991 [32]; Николаев В.Б., 2005 [13]). Использование щадящего способа выделения ЛПС из франциселл по методу R.P. Darveau, R.E. Hancock (1983) [27], основанному на обработке клеток панкреатическими нуклеазами, додецилсульфатом натрия и ЭДТА, позволило

© 2019 г. Кузнецова Е.М., Борисова С.В., Волох О.А., Никифоров А.К.

* **Автор для переписки:**

Кузнецова Екатерина Михайловна

к.б.н., ст.н.с. лаборатории холерных вакцин ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

E-mail: rusrapi@microbe.ru, kuznetsova.em@mail.ru

получить более чистые препараты ЛПС. Содержание белка в полученном препарате по общему весу составляет 0,1%, НК — 1%, липидов — от 2 до 5%, способ использовался при разработке дот-иммуноанализа (ДИА) (Аронова Н.В., Павлович Н.В., 2000) [2]. Кроме того, известен способ извлечения ЛПС *F. tularensis* с помощью коммерческого реагента для выделения РНК, содержащего фенол и гуанидин тиоционат. Полученный подобным способом ЛПС характеризуется низким содержанием свободного фосфора (11% от общего объема) и применялся при конструировании микрочипов для детекции противотуляреминых антител (Yi E.C., Hackett M. 2000 [52]; Thirumalarura N.R. et al., 2005 [48]). В последнее время при разработке препаратов для серодиагностики туляремии зарубежными авторами все чаще используются либо коммерческие буферы для экстракции ЛПС с последующей очисткой готового препарата протеиназой К (Grunow R. et al., 2000 [34]; Kischel N., 2002 [41]), либо уже готовые коммерческие препараты ЛПС *F. tularensis* (Chaignat V. et al., 2014) [26]. Независимо от способа получения и хемотипа ЛПС *F. tularensis* установлено, что он не обладает протективной активностью и не может обеспечить защиту от вирулентных штаммов возбудителя инфекции.

При извлечении белков ВМ грамотрицательных бактерий наиболее распространенным методом является разрушение клеток с последующим дифференциальным центрифугированием и/или экстракцией детергентами (Родионова И.В., Захаренко В.И. 1990 [17]; Khlebnikov V.S. et al., 1996 [39]; Surcel H.M. et al., 1989 [47]). В более поздних исследованиях очищенные фракции мембранных белков *F. tularensis* извлекали экстракцией карбонатом натрия или используя центрифугирование в градиенте плотности сахарозы после осмотического лизиса клеток (Pavkova I. et al., 2005 [44]; Huntley J.F. et al., 2007 [37]; Post D.M.B. et al., 2017 [45]). Полученные подобным способом препараты ВМ туляреминого микроба содержат, согласно литературным данным, до 35 белков и липопротеинов с молекулярными массами от 10 до 143 кДа, обладают иммунодиагностической значимостью, но ни один из них не способен индуцировать протективный иммунный ответ. С другой стороны, использование комплексных препаратов ВМ или конъюгированных с адьювантом позволяет получить выраженный вакцинирующий эффект для белых мышей против заражения как голарктическими, так и неарктическими штаммами возбудителя туляремии (Huntley J.F. et al., 2008) [38]. Изолированные иммуноспецифические белки ВМ туляреминого микроба получают в основном двумя методами: препаративным

электрофорезом и с использованием рекомбинантных технологий (Лящук А.М. и др. 2006 [11]; Павлов В.М., Дятлов И.А., 2012 [15]; Горбатов А.А. и др., 2017 [4]; Bevanger L. et al., 1989 [25]; Surcel H.M. et al., 1989 [47]; Sjostedt A. et al., 1990 [46]; Ericsson M. et al., 1997 [30]; Barel M. et al., 2008 [24]; Hickey A.J. et al., 2011 [36]).

В наружной мембране клетки ЛПС специфически взаимодействуют с белками, образуя устойчивые к химическим воздействиям ЛПС-белковые комплексы (ЛПБК). Наибольшее количество основополагающих работ по антигенному составу *F. tularensis* посвящено исследованию так называемых антигенов Ларсона (экстракция серным эфиром) и Буавена (экстракция трихлоруксусной кислотой), которые и представляют собой подобные структуры. Описанные антигенные комплексы практически не отличаются между собой, хотя серологическая активность и иммуногенность антигена Буавена значительно выше, что послужило основанием для его использования при изготовлении коммерческого туляреминого эритроцитарного диагностикума. Протективной активностью данные антигены не обладали (Олсуфьев Н.Г., 1975) [14].

В дальнейшем при исследовании компонентов ВМ *F. tularensis* рядом отечественных исследователей в Институте иммунологии (п. Любучаны) в 1990-х годах была разработана схема получения препарата ВМ возбудителя туляремии, который обладал протективными свойствами. Метод заключался в обработке экстракта мембран клеток *F. tularensis* ультразвуком с последующим ультрацентрифугированием (Khlebnikov V.S. et al., 1996) [39]. Данный препарат содержал белок (12–22%), углеводы (15–30%) и липиды (до 40%), по данным SDS-PAGE электрофореза, в его состав входило до 25 белковых фракций с молекулярными массами от 10 до 80 кДа. Из протективного препарата ВМ туляреминого микроба были получены ЛПБК различными методами. Обработка ВМ растворами дезоксихолата натрия с ЭДТА с последующей гель-фильтрацией позволила выделить четыре фракции ЛПБК с различными молекулярными массами и химическим составом. Наиболее иммунологически активная фракция IV имела молекулярную массу 15–35 кДа, в ее состав входили субъединицы с мол. массами 15, 17 и 19 кДа, соотношение ЛПС:белок составляло 1:1. Данная методика в дальнейшем послужила основой для разработки метода выделения и очистки белка 17 кДа из R-варианта вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (Кулеватский Д.П., 1994) [10]. Установлено, что очищенный белок 17 кДа обладал слабым защитным эффектом (ED₅₀ = 240 мкг против штамма 503 в дозе 50 ж.м.к.), иммунизация же комплексом ЛПС-белок 17 кДа обеспечивала дозозави-

симый эффект выживания мышей. Наиболее выраженный защитный эффект наблюдался при их соотношении 1:2 ($ED_{50} = 38$ мкг). Была предложена методика аффинной хроматографии препарата ВМ с применением превентивных моноклональных антител FВ11х, специфичных к туляремийному ЛПС. Выделенный подобным способом антиген представлял собой ЛПБК, основные белки которого представлены полипептидами с мол. массами 17 и 43 кДа, и проявлял выраженный протективный эффект в отношении мышей при заражении культурой вирулентного штамма 503 (Аверин С.Ф. и др. 1992) [1]. Кроме того, с помощью гель-фильтрации на сефарозе 6В в две стадии из экстракта ВМ клеток, обработанных ультразвуком, выделена фракция с молекулярной массой 450 кДа, представляющая собой очищенный белок GroEL (63 кДа) *F. tularensis*, способный взаимодействовать с иммуноглобулинами человека и кролика. Ни белок 63 кДа, ни сконструированные из него комплексы с различными соотношениями ЛПС:белок протективными свойствами не обладали (Коровина О.В., 1993 [6]). При многократном ультрацентрифугировании фракции ВМ туляремийного микроба был получен препарат С-комплекс (Патент РФ 2221591 [16]), который благодаря достаточно высокой протективной активности рассматривался как прототип химической туляремийной вакцины (ХТВ). В РосНИПЧИ «Микроб» был разработан метод получения протективного антигенного комплекса (ПАК) как из клеток, так и из культуральной жидкости методом поэтапного осаждения при понижающемся рН (Шепелёв И.А., 2005) [23]. Данный антигенный комплекс использовался при разработке как профилактических, так и диагностических препаратов (Храмкова Е.М. и др., 2007 [22]; Волох О.А. и др., 2013 [3]). Николаевым В.Б. (2005 [13]) предложен комплекс методических приемов, включающий в себя ультразвуковую дезинтеграцию, экстракцию клеток растворами мочевины, детергентов, дифференциальное центрифугирование, осаждение органическими растворителями, гель-хроматографию, позволяющий изолировать 17 антигенных препаратов различного химического состава. Установлено, что наибольшей протективной активностью в опытах на лабораторных животных обладал препарат клеточных оболочек белково-углеводной природы, содержащий в своем составе около 25 полипептидных полос. Позднее, благодаря продолжению исследований в этом направлении были получены препараты клеточных стенок *F. tularensis* четырех подвигов, иммуногенная активность которых указывает на перспективность их использования в качестве компонентов при создании вакцин (Корнева А.В. и др., 2014 [5]; Старовойтова Т.П. и др., 2017 [19]).

Изолирован полигрупповой водорастворимый антиген из трех штаммов *F. tularensis* разных подвигов, подобрана схема иммунизации кроликов-продуцентов для получения на его основе иммунных туляремийных сывороток, диагностическая ценность которых была подтверждена и позволила наладить их производственный выпуск (Тюменцева И.С. и др., 2012 [20]). Исследования комплексных туляремийных антигенов дали возможность выделить из осветленного лизата бактерий *F. tularensis* 15НИИЭГ «кислотонерастворимый комплекс» (КНК) — белково-липополисахаридную фракцию, в составе которой присутствует не менее шести иммунодоминантных белковых компонентов с мол. массами от ≈ 17 до 87 кДа, и показать перспективы его использования в качестве антигена в реакциях при изучении клеточного иммунитета (Фирстова В.В. и др., 2014 [21]; Мокриевич А.Н. и др., 2019 [12]). Иммунизация мышей КНК как в виде коллоидного раствора, так и на твердом носителе (в форме микрокапсул и на алюмогеле) эффективно индуцировала гуморальный иммунный ответ, но не позволяла полностью защитить мышей от заражения природным штаммом *F. tularensis* из-за слабой специфической активации клеточного звена иммунитета (Сомов А.Н. и др., 2017) [18]. Обзор методов выделения основных иммунореактивных антигенов ВМ *F. tularensis* приведен в таблице 1.

Представленные методы извлечения белков и ЛПБК ВМ возбудителя туляремии не давали возможности полностью охарактеризовать полученные комплексы из-за грубого способа извлечения данных антигенов и наличия в их составе посторонних веществ, содержащихся в периплазматической и/или цитоплазматической мембране *F. tularensis*. Первый предполагаемый белок ВМ *F. tularensis* с молекулярной массой 43 кДа удалось идентифицировать при исследовании экстрактов бактериальных клеток в иммуноблоттинге с сыворотками людей, переболевших туляремией во время вспышки в Норвегии, это был белок ForA (Bevanger, L., Maeland J.A., Naess A.I. 1989) [25]. С 2000 года 2D-электрофорез в сочетании с иммуноблоттингом начал активно использоваться исследователями для идентификации иммунодоминантных антигенов *F. tularensis* (Havlasova J., et al., 2002 [35]; Kilmury S.L.N., Twine S.M., 2011 [40]). Этот методический подход получил название «SERPA» — серологический анализ протеома, который в сочетании с достижениями в области геномики и масс-спектрометрии позволил проводить идентификацию отдельных белков *F. tularensis*, обладающих иммунореактивностью и стимулирующих иммунную систему организма (Fulton K.M., Twine S.M., 2019) [33].

Методы выделения антигенных компонентов ВМ *Francisella tularensis*

Источник выделения	Антиген	Метод выделения	Литературный источник
Бактериальные клетки	ЛПС	водно-фенольная экстракция	Westphal O., et al., 1965 [50]
		аффинная хроматография на полимиксине В и обработка тритоном X-114 или твином 80, экстракцией мочевиной	Николаев В.Б., 2005 [13]
		экстракция SDS и ЭДТА	Darveau R.P., et al., 1983 [27]
		с помощью коммерческих реагентов для выделения РНК	Yi E.C., Hackett M. 2000 [52]
		коммерческие буферы для экстракции ЛПС, обработка Протеиназой К	Grunow R. et al., 2000 [34]; Kischel N., 2002 [41]
	Белки ВМ	ультразвук, дифференциальное центрифугирование, экстракция 0,5% раствором N-лаурил-саркозината	Surcel H.M. et al., 1989 [47]; Родионова И.В., Захаренко В.И. 1990 [17]
		обработка фенолом, ультразвук, ультрацентрифугирование; колоночная 2-стадийная гель-фильтрация на сефарозе 6В	Коровина О.В., 1993 [6]
		экстракция карбонатом натрия	Pavkova I. et al., 2005 [44]
		осмотический лизис сферопластов клеток, центрифугирование в градиенте плотности сахарозы	Huntley J.F. et al., 2007 [37]
		препаративный электрофорез и электроэлюция	Bevanger L. et al., 1989 [25]; Surcel H.M. et al., 1989 [47]; Ericsson M. et al., 1997 [30]
		рекомбинантные технологии	Sjostedt A. et al., 1990 [46]; Лящук А.М. и др. 2006 [11]; Barel M. et al., 2008 [24]; Горбатов А.А. с соавт., 2017 [4]
	ЛПБК ВМ	экстракция ТХУ, серным эфиром, фенолом	Олсуфьев Н.Г., 1975 [14]
		обработка фенолом, ультразвуком, ультрацентрифугирование	Khlebnikov V.S. et al., 1996 [39]; Патент РФ 2221591 [16]
		обработка фенолом, ультразвуком, ультрацентрифугирование, обработка дезоксихолом натрия с ЭДТА, гель-фильтрация	Кулевацкий Д.П., 1994 [10]
		обработка фенолом, ультразвуком, ультрацентрифугирование, аффинная хроматография на колонке с МкАт FB11X	Аверин С.Ф. и др. 1992 [1]
		ультразвук, экстракция растворами мочевины, твина 80, цетавлона, дифференциальное центрифугирование, осаждение органическими растворителями, гель-хроматография	Николаев В.Б., 2005 [13]
		ультразвук, водно-солевая экстракция, центрифугирование	Тюменцева И.С. и др., 2012 [20]
		обработка раствором мочевины, ультрацентрифугирование	Корнева А.В. и др., 2014 [5]
	Бактериальные клетки, культуральная жидкость	обработка фенолом, гидродинамический стресс, поэтапное осаждение при понижающемся рН	Шепелёв И.А., 2005 [23]
		обработка фенолом, закисление лизата клеток 5М уксусной кислотой, центрифугирование	Фирстова В.В. и др., 2014 [21]; Мокриевич А.Н. и др., 2019 [12]

Разработан новейший подход — протеомный микрочип, который позволяет за один эксперимент исследовать иммунохимическую активность белков с большим количеством сывороток (свыше 800 сывороток), но требует соответствующего оснащения лабораторий (Eyles J.E. et al., 2007) [31]. Для анализа комплексных антигенов туляремийного микроба сложной химической природы нами был разработан

методический подход, включающий в себя определение их молекулярной массы, анализ физико-химических свойств, анализ иммунохимической активности, определение их субъединичного состава и идентификацию иммунореактивных компонентов, который позволил охарактеризовать препараты ПАК и ПАК-М из *F. tularensis* 15НИИЭГ (Кузнецова Е.М. и др. 2012, 2019) [8, 9] (рис. 1).

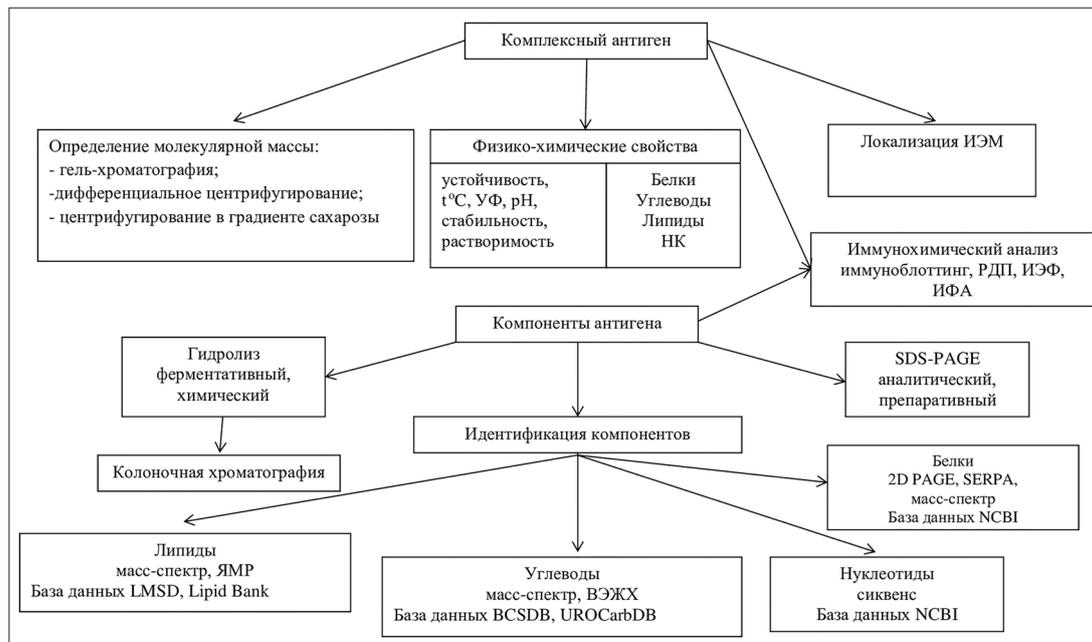


Рис. 1. Алгоритм анализа антигенных комплексов туляремийного микроба сложной химической природы

Способность *F. tularensis* вызывать заболевание в организме хозяина, по-видимому, связано с его способностью размножаться внутриклеточно, а не способностью продуцировать какие-либо специфические токсины. В организме хозяина возбудитель туляремии включает адаптационные механизмы, которые позволяют им выжить в агрессивных условиях. Установлено, что по мере прохождения *F. tularensis* через внутриклеточный цикл (фагоцитоз, спасение от фагосомы, логарифмическая цитоплазматическая репликация, индукция аутофагических вакуолей и клеточный выход) бактерия *F. tularensis* адаптируется за счет модулирования экспрессии некоторых генов (Павлов В.М., Дятлов И.А., 2012 [15]; Wehrly et al., 2009 [49]). Были проведены исследования, имитирующие во время роста *in vitro* одно или несколько стрессовых воздействий, которым подвергается *F. tularensis* во время пролиферации внутри хозяина. Изучение изменения в бактериальном протеоме *F. tularensis* в ответ на воздействие перекиси водорода, имитация реакции окислительного стресса показали повышение уровня экспрессии белков-шаперонов,

таких как GroEL, DnaK, ClpB и SodB (Ericsson M. et al., 1994 [29]; Lenco J. et al., 2005 [42]). Факторы вирулентности, такие как белок острова патогенности, IglC, также был идентифицирован в некоторых из этих исследований. Многими исследователями было показано, что выращивание штамма *F. tularensis* в условиях ограничения железа и изменение температуры роста влияют на экспрессию многих бактериальных генов возбудителя (Deng et al., 2006 [28]; Kilmury S.L.N., Twine S.M., 2011 [40]). Благодаря созданию стрессовых условий *in vitro*, которые наиболее близко имитируют среду хозяина, стало возможным проводить анализ изменения протеома *F. tularensis* и увеличивать продукцию иммунореактивных белков-шаперонов в процессе выделения его антигенов.

В конечном итоге теоретические предпосылки и полученные нами экспериментальные данные позволили разработать методический подход к биотехнологии получения иммунологически активных бактериальных антигенов на модели *F. tularensis* 15НИИЭГ, представленный на схеме (рис. 2).

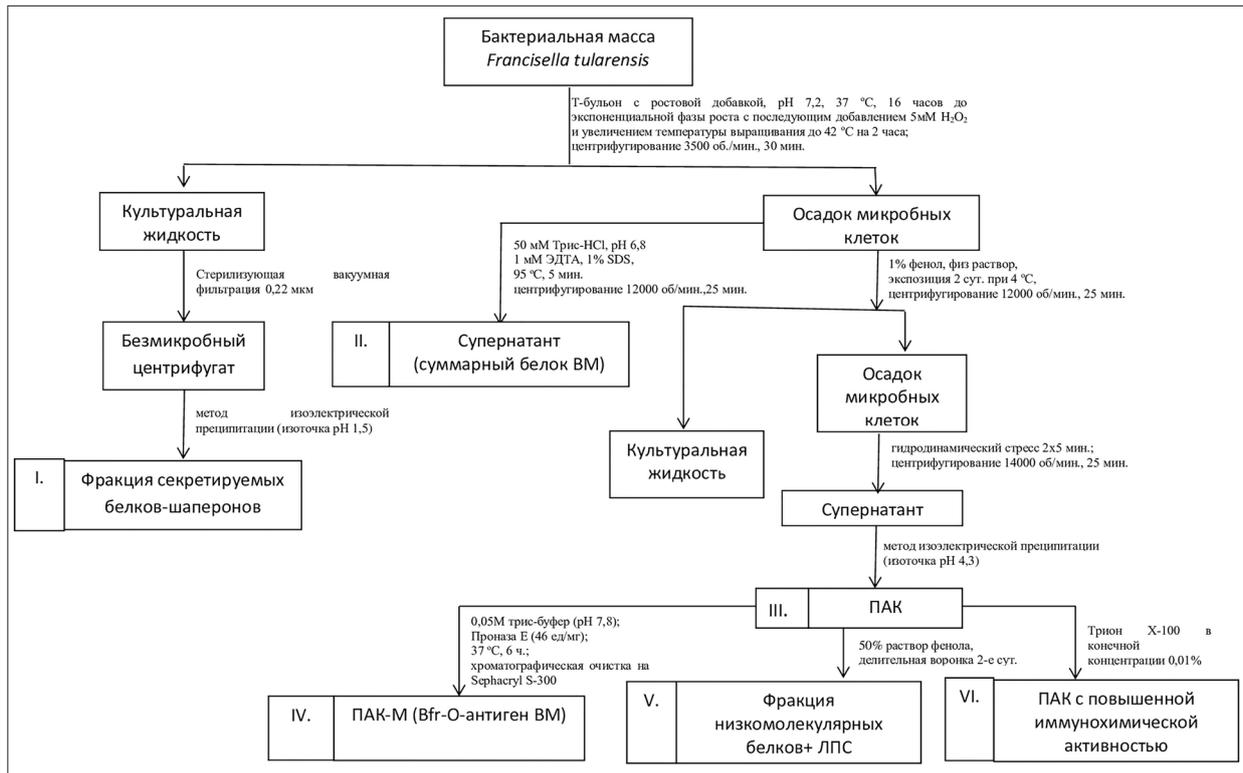


Рис. 2. Схема поэтапного фракционирования клеток туляремиального микроба для выделения антигенов

Первый этап технологии включает в себя получение фракции секретируемых белков-шаперонов из бактериальной массы вакцинного штамма *F. tularensis* 15НИИЭГ. Сущность метода заключается в том, что клетки туляремии помещаются в условия, моделирующие условия пребывания патогена внутри макрофага (использование питательных сред на основе сердечно-мозговой вытяжки и гидролизата белков животного происхождения, добавление перекиси водорода, повышение температуры выращивания до 42 °C), благодаря чему микроб увеличивает выход белков-шаперонов. Подобные белки являются иммунореактивными, стимулирующими выработку Т-клеток и продукцию гамма-интерферона, являются перспективными компонентами разрабатываемых вакцинных препаратов (субъединичных и ДНК-вакцин) и рассматриваются в качестве диагностической мишени. Переработка бактериальной массы с помощью химических агентов позволяет получать суммарный клеточный белок (II этап), который содержит в своем составе, согласно SDS-PAGE, до 15 белковых полос, обладает высокой иммунохимической активностью в ИФА и может использоваться в лабораторной практике. Дальнейшая работа (III этап) по выделению антигенов проводилась путем разрушения клеток *F. tularensis* с помощью гидродинамического стресса с последующим выделением пула ЛПС-белковой фракции BM (ПАК)

методом изоэлектрической преципитации при постепенно понижающемся рН (изоточка рН 4,3) с поэтапным освобождением от балластных веществ. Полученный подобным способом препарат ПАК обладал высокой иммунохимической и протективной активностью и использовался при разработке химической туляремиальной вакцины и диагностических тест-систем (Храмкова Е.М. и др., 2007 [22]; Волох О.А. и др., 2013 [3]). На IV этапе технологии препарат ПАК обрабатывали протеолитическим ферментом проназа Е. Полученная с помощью ферментативного гидролиза и хроматографически очищенная фракция *F. tularensis* ПАК-М (Bfr-O антиген) обладала высокой антигенной и иммунобиологической активностью (Кузнецова Е.М. и др., 2019) [9]. После водно-фенольной экстракции препарата ПАК была получена фракция низкомолекулярных белков и S-ЛПС туляремиального микроба, а обработка антигена раствором детергента Трион X-100 или саркозила увеличивала иммунохимическую активность антигена, что может в дальнейшем использоваться при конструировании диагностических тест-систем.

Таким образом, теоретические положения и наши эксперименты позволили разработать комплексный методический подход к выделению иммунобиологически активных антигенных компонентов внешних мембран туляремиального микроба с позиций особенностей хими-

ческой и антигенной структуры клеток и участия определенных антигенных комплексов в процессах иммуно- и патогенеза. Представленный алгоритм анализа ПАК и ПАК-М позволил охарактеризовать состав препаратов и может быть использован для анализа комплексных антигенов *F. tularensis* сложной химической природы. Разработанная и апробированная технология ступенчатой разборки клеток возбудителя туляремии на субклеточные фракции и компоненты позволяет провести практически безотходную переработку бактериальной массы с получением специфических антигенов и их компонентов, пригодных для конструирования высокоэффективных профилактических и диагностических препаратов.

Литература

1. Аверин С.Ф., Хлебников В.С., Головлев И.Р. и др. Выделение протективного антигена из состава внешних мембран возбудителя туляремии и его основные свойства // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций: Тез. докл. [Рос. науч. конф.]. — Волгоград: ВНИПИ, 1992. — С. 68. — 232, [1] с.
2. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Использование препаратов ЛПС *F. tularensis* в точечном ИФА для обнаружения противотуляремийных антител // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2000. — № 5. — С. 75–78.
3. Волох О.А., Кузнецова Е.М., Смолькова Е.А. и др. Экспериментальный препарат для специфической профилактики туляремии // Проблемы ООИ. — 2013. — Вып. 2. — С. 73–77.
4. Горбатов А.А., Панферцев Е.А., Баранова Е.В. и др. Диагностическая значимость рекомбинантного белка GroEL FTT_1696 для выявления противотуляремийных антител // Биотехнология. — 2017. — Т. 2. — № 3. — С. 9–15.
5. Корнева А.В., Николаев В.Б., Ястремская К.Ю. и др. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвидов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2014. — № 4(77). — С. 73–77.
6. Коровина О.В. Иммуноглобулинсвязывающий белок 63 кДа внешней мембраны возбудителя туляремии: дис. ... канд. мед. наук. — Любучаны, 1993. — 136 с.
7. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н. и др. Эпидемическая активность природных очагов туляремии на территории Российской Федерации в 2018 г. и прогноз ситуации на 2019 г. // Проблемы ООИ. — 2019. — № 1. — С. 32–41.
8. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Шепелёв И.А., Никифоров А.К. Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремийного микроба // Мол. ген., микробиол. и вирусол. — 2012. — № 3. — С. 22–25.
9. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Краснов Я.М. и др. Комплекс Vfr-O-антиген внешних мембран *Francisella tularensis*: получение, характеристика, возможности использования // Биотехнология. — 2019. — Т. 35. — № 1. — С. 73–81.
10. Кулевацкий Д.П. Липополисахаридобелковые комплексы внешней мембраны возбудителя туляремии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Саратов, 1994. — 20 с.
11. Ляцук А.М., Лунин В.Г., Карягина А.С. и др. Получение и характеристика рекомбинантного белка TUL4 из *F. tularensis*, потенциального компонента генно-инженерной субъединичной противотуляремийной вакцины // Биотехнология. — 2006. — № 5. — С. 32–38.
12. Мокриевич А.Н., Кравченко Т.Б., Фирстова В.В., Титарева Г.М., Дятлов И.А., Тимофеев В.С. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования / Под ред. акад. РАН И.А. Дятлова. — М.: Изд-во «Династия», 2019. — 264 с.
13. Николаев В.Б. Физико-химические и иммунобиологические свойства антигенов туляремийного микроба: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Иркутск, 2005. — 23 с.
14. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. — М.: Медицина. — 1975. — 192 с.
15. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. — М., 2012. — 267 с.
16. Патент РФ 2221591 Способ получения препарата для активной иммунизации против туляремии. — А61К 39/40, C12N 1/00, A61P 31/00. — 20.01.2004.
17. Родионова И.В., Захаренко В.И. Антигенный состав белков наружной мембраны туляремийного микроба // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. — 1990. — № 11. — С. 16–18.
18. Сомов А.Н., Кравченко Т.Б., Павлов В.М. и др. Антигенные и иммуногенные свойства кислотонерастворимого комплекса *Francisella tularensis* штамма 15 НИИЭГ в растворимой, адсорбированной и микрокапсулированной формах // Биотехнология. — 2017. — Т. 33. — № 5. — С. 23–34.
19. Старовойтова Т.П., Дубровина В.И., Витязева С.А. и др. Сравнительная характеристика иммунологической перестройки организма белых мышей, иммунизированных клеточными стенками *Francisella tularensis* разных подвигов // Acta Biomedica Scientifica. — 2017. — Т. 2. — № 4. — С. 101–106.
20. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Алиева Е.В. и др. Антигены и антисыворотки *Francisella tularensis*: к вопросу иммунодиагностики туляремии // Мед. вестник Сев. Кавказа. — 2012. — № 1. — С. 49–52.
21. Фирстова В.В., Павлов В.М., Горбатов А.А. и др. Формирование антитуляремийного клеточного и гуморального иммунного ответа, индуцированного у мышей

- F. tularensis* 15НИИЭГ // Иммунология. — 2014. — № 3. — С. 147–150.
22. Храмова Е.М., Волох О.А., Шепелёв И.А. и др. Использование «С»-комплекса туляремийного микроба для создания диагностических тест-систем // Биотехнология. — 2007. — № 2. — С. 72–77.
 23. Шепелёв И.А. Оптимизация условий масштабируемого культивирования туляремийного микроба в технологиях получения протективных антигенов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Саратов, 2005. — 22 с.
 24. Barel M., Hovanessian A. G., Meibom K., et al. A novel receptor-ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu // BMC Microbiology. — 2008. — Vol. 145. — No. 8. — P. 1–19.
 25. Bevanger L., Maeland J. A., Naess A.I. Competitive enzyme immunoassay for antibodies to a 43 000-molecular-weight *Francisella tularensis* outer membrane protein for the diagnosis of tularemia // J. Clin. Microbiol. — 1989. — Vol. 27. — P. 922–926.
 26. Chaignat V., Djordjevic-Spasic M., Ruettger A. et al. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia // BMC Infect. Diseases. — 2014. — Vol. 14(234). — P. 1–6.
 27. Darveau R.P., Hancock R.E.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains // J. Bacteriol. — 1983. — Vol. 155. — P. 831–838.
 28. Deng K., Blick R.J., Liu W., Hansen E.J. Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation // Infect. Immun. — 2006. — Vol. 74. — P. 4224–4236.
 29. Ericsson M., Tärnvik A., Kuoppa K., Sandström G., Sjostedt A. Increased synthesis of DnaK, GroEL, and GroES homologs by *Francisella tularensis* LVS in response to heat and hydrogen peroxide // Infect. Immun. — 1994. — Vol. 62. — P. 178–183.
 30. Ericsson M., Golovliov I., Sandström G., et al. Characterization of the nucleotide sequence of the groE operon encoding heat shock proteins chaperone-60 and -10 of *Francisella tularensis* and determination of the T-cell response to the proteins in individuals vaccinated with *F. tularensis* // Infection and Immunity. — 1997. — Vol. 65(5). — P. 1824–1829.
 31. Eyles J. E., Unal B., Hartley M.G., et al. Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray // Proteomics. — 2007. — Vol. 7(13). — P. 2172–2183.
 32. Fulop M., Webber T., Manchee R.J., Kelly D.C. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *F. tularensis* // J. of Clinical Microbiology. — 1991. — Vol. 29(7). — P. 1407–1412.
 33. Fulton K.M., Twine S.M. Immunoproteomics: Methods and protocols (Methods in molecular biology). — Humana Press, 2019. — Series Volume. 2024. — P. 59–78. — XI, 380 p.
 34. Grunow R.W., Spletstoeser S., McDonald C., et al. Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2000. — Vol. 7. — P. 86–90.
 35. Havlasova J., Herychova L., Halada P. et al. Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain // Proteomics. — 2002. — Vol. 2. — P. 857–867.
 36. Hickey A.J., Hazlett K.R.O., Kirimanjeswara G.S., Metzger D.W. Identification of *Francisella tularensis* outer membrane protein A (FopA) as a protective antigen for tularemia // Vaccine. — 2011. — Vol. 29(40). — P. 6941–6947.
 37. Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V. Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins // J. Bacteriol. — 2007. — Vol. 189(2). — P. 561–574.
 38. Huntley J.F., Conley P.G., Rasko D.A. et al. Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A *Francisella tularensis* // Infect. and Immun. — 2008. — Vol. 76(8). — P. 3664–3671.
 39. Khlebnikov V.S., Golovliov I.R., Kulevatsky D.P. et al. Outer membranes of a lipopolysaccharide-protein complex (LPS-17 kDa protein) as chemical tularemia vaccines // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 1996. — Vol. 13. — P. 227–233.
 40. Kilmury S.L., Twine S. The *Francisella tularensis* proteome and its recognition by antibodies // Front. Microbiol. — 2011. — Vol. 1(143). — P. 1–22.
 41. Kischel N. Vergleich von ELISA, Immunfluoreszenz, Durchflußzytometrie, Westernblot und Agglutinationstest zum Nachweis von Serumantikörpern gegen *Francisella tularensis*. — München, 2002. — 76 S.
 42. Lenco J., Pavkova I., Hubalek M., Stulik J. Insights into the oxidative stress response in *Francisella tularensis* LVS and its mutant DeltaiglC1 + 2 by proteomics analysis // FEMS Microbiol. Lett. — 2005. — Vol. 246. — P. 47–54.
 43. Mansour A.A., Banik S., Suresh R.V. et al. An improved Tobacco Mosaic Virus (TMV)-conjugated multiantigen subunit vaccine against respiratory tularemia // Front. Microbiol. — 2018. — Vol. 9(1195). — P. 1–21.
 44. Pavkova I., Hubalek M., Zechovska J., Lenco J., Stulik J. *Francisella tularensis* live vaccine strain: proteomic analysis of membrane proteins enriched fraction // Proteomics. — 2005. — Vol. 5. — P. 2460–2467.
 45. Post D.M.B., Slutter B., Schilling B. et al. Characterization of inner and outer membrane proteins from *Francisella tularensis* strains LVS and Schu S4 and identification of potential subunit vaccine candidates // MBio. — 2017. — Vol. 8(5). — P. 1–11.
 46. Sjostedt A., Sandström G., Tärnvik A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain *Francisella tularensis* LVS stimulate T cells from naturally infected individuals // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28(1). — P. 43–48.

47. Surcel H.M., Sarvas M., Helander J.M., Herva E. Membrane proteins of *Francisella tularensis* LVS differ in ability to induce proliferation of lymphocytes from tularemia-vaccinated individuals // *Microbiol. Patogen.* — 1989. — Vol. 7. — P. 411–419.
48. Thirumalapura N.R., Morton R.J., Ramachandran A., Malayer J.R. Lipopolysaccharide microarrays for the detection of antibodies // *J. Immun. Methods.* — 2005. — Vol. 298. — P. 73–81.
49. Wehrly T.D., Chong A., Virtaneva K. et al. Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages // *Cell Microbiol.* — 2009. — Vol. 11(7). — P. 1128–1150.
50. Westphal O., Jann K., Roy L. et al. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure / In: *Methods in Carbohydrate Chemistry.* — New York: Academic Press. Inc., 1965. — Vol. 5. — P. 83–91.
51. Yanes H., Hennebique A., Pelloux I. et al. Evaluation of in-house and commercial serological tests for diagnosis of human tularemia // *J. Clin. Microbiol.* — 2018. — Vol. 56(1). — P. 1–9.
52. Yi E.C., Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria // *Analyst.* — 2000. — Vol. 125(4). — P. 651–656.

AN INTEGRATED METHODOLOGICAL APPROACH FOR THE ISOLATION OF IMMUNOBIOLOGICALLY ACTIVE ANTIGENIC COMPONENTS OF THE OUTER MEMBRANES OF TULAREMIA MICROBE

Ye.M. KUZNETSOVA, S.V. BORISOVA, O.A. VOLOKH, A.K. NIKIFOROV

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» Rospotrebnadzor, Saratov

A review of the general theoretical principles of various researchers and experimental contributions has been given, which made it possible to develop a comprehensive methodological approach to isolating the immunobiologically active antigenic components of the outer membranes of the tularemia microbe from the standpoint of the characteristics of the chemical and antigenic structure of cells and the participation of certain antigenic complexes in the processes of immuno- and pathogenesis. The presented algorithm for the analysis of protective antigenic complex (PAC and PAC-M) makes it possible to characterize the composition of the preparations and can be used to analyze complex antigens of *F. tularensis* of complex chemical nature. The developed and tested technology for stepwise disassembling of tularemia pathogen cells into subcellular fractions and components allows for virtually waste-free processing of the bacterial mass to produce specific antigens and their components suitable for the construction of highly effective prophylactic and diagnostic drugs.

Keywords: tularemia microbe, immunobiologically active antigenic components of the outer membranes, integrated method, review.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОКОВ И ПОЛУЧЕНИЯ БИОГАЗА: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Д.О. КАРЯКИН^{1*}, Н.М. ЩЕГОЛЬКОВА^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт водных проблем РАН»,

² Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Биогаз, хоть и является относительно новым источником альтернативной энергии, но, несомненно, имеющим большие перспективы. Современные технические решения позволяют получать биогаз из отходов, которые образуются от очистки сточных вод. Это имеет как преимущества, например, в виде низких цен на сырье и получаемое топливо, так и недостатки. Новые технологические решения, способные увеличить выход биогаза, а, значит, и экономическую отдачу, востребованы уже сейчас. В последнее время было предложено множество вариантов сырья для биогаза, но одним из самых конкурентных являются микроводоросли (получаемые на очистных сооружениях), так как эта биомасса (в отличие от активного ила или отходов сельскохозяйственного производства) является продуктом фотосинтеза непосредственно в реакторе очистных сооружений. Это означает, что углерод получаемого биогаза — это продукт преобразования углекислого газа в метан непосредственно на очистном сооружении. В настоящей статье проводится анализ различных методов использования биомассы микроводорослей в современной практике. Работа представляет собой обзор наиболее значимых исследований по нескольким тематикам: 1) очистка сточных вод фотобиореакторами, 2) производство биогаза из биомассы микроводорослей, 3) использование микроводорослей в архитектуре. Для этих категорий дается обобщенный анализ новейших разработок и основных технологических решений.

Ключевые слова: микроводоросли, фотобиореакторы, метан, биогаз, очистка стоков.

Введение

Биогаз рассматривается в последнее время как один из основных источников получения альтернативной энергии. Существуют три главных лимитирующих фактора, влияющих на увеличение производства биогаза: высокая стоимость сырья, необходимость использования локального сырья, отсутствие технических и технологических решений, которые могут сделать энергию биогаза экономически привлекательной. Основные коммерческие способы применения биогаза: генерация электричества, когенерация тепла и электричества, интеграция с действующими газовыми сетями, транспортное топливо, химическое производство. Также можно отметить использование биогаза для стабилизации энергетического баланса в системе энергоснабжения, в том числе для установок альтернативной энергетики, для использования в домохозяйствах городских территорий развивающихся стран, производства удобрений (из отходов производства биогаза) и биоводорода [9, 25].

Среди всех стран, которые занимаются проблемами биогаза, стоит упомянуть Германию, которая благодаря значительным капиталовложениям в научно-исследовательские работы в области исследования сырья для анаэробного сбраживания (АнС) значительно опережает другие страны по техническим решениям. Дания, Австрия, Италия, Китай и Швеция также применяют эти технологии и проводят масштабные исследования. Внедрение любой инновации в реальное производство, в том числе — использование биогаза, влечет за собой необходимость обеспечить грамотные маркетинговые исследования [11], для проведения которых необходим обзор всех возможных технических и технологических решений для построения экономически состоятельных моделей. В нашей работе мы сгруппировали актуальные идеи выращивания биомассы для получения биогаза и использования биореакторов в архитектуре.

Цель обзорной работы: опираясь на научные публикации и собственные результаты предыдущих исследований, проанализировать методы и подходы к использованию биомассы микроводорослей в современной практике и выделить наиболее значимые направления исследований по их практическому применению.

© 2019 г. Карякин Д.О., Щеголькова Н.М.

* Автор для переписки:

Карякин Дмитрий Олегович

аспирант ФГБУН «Институт водных проблем РАН»

E-mail: dime.angeler@gmail.com

Типы фотобиореакторов для выращивания микроводорослей

Поисками альтернативных источников энергии человечество занимается с начала XX века. Исследователи разработали способ вырабатывать биотопливо с использованием биомассы микроводорослей еще в 30–40-е годы XX века. Эпоха промышленного культивирования в специальных аппаратах — фотобиореакторах (ФБиО) началась во второй половине XX столетия. Научные разработки фотобиореакторов для промышленного производства начали появляться в США в 1970-е годы в качестве компонента стратегии национальной энергетической безопасности. С тех пор можно выделить несколько основных типов устройств для культивирования — открытые и закрытые.

Открытые фотобиореакторы представляют собой искусственные водоемы с принудительным движением воды. Их отличительной особенностью является большая площадь (в том числе площадь испарения), низкая концентрация водорослей и зависимость от погодных условий/климата, так же, как и от солнечной радиации.

Закрытые фотобиореакторы представлены трубчатыми, панельными, эрлифтными колонными, спиральными и некоторыми другими типами. Они менее подвержены неблагоприятным внешним условиям и больше подходят для применения в городской среде. Максимальная фотосинтетическая эффективность (эффективность

преобразования солнечной энергии) составляет 6–9%, что в несколько раз больше, чем у открытых.

Трубчатые ФБиО состоят из прозрачных стеклянных или пластиковых трубок. Панельные представляют собой квадратные или прямоугольные емкости с большой площадью поверхности, наполненные биомассой. Их особая конструкция позволяет располагать емкости близко друг к другу. Они имеют самую высокую степень поглощения солнечной энергии. Колонные (эрлифтные) биореакторы — это цилиндрические системы, в которых газ подается под давлением в виде пузырей в турбулентном режиме. Также существуют и другие не менее интересные по конструкции системы — спиральные реакторы в виде группы параллельных колец вокруг цилиндрического основания (в котором может быть источник освещения) и пирамидальные — в виде, соответственно, пирамидально сложенных трубок [58]. Зависимость продуктивности биомассы микроводорослей от вида культуры в определенных типах фотобиореакторов показана в таблице 1. Из литературных источников видно, что максимальная продуктивность получена при использовании *Chlorella sp.* и *Scenedesmus sp.* в колонном и мембранном ФБиО, которая составляет 128–2530 мг/(л·сут). Такие относительно высокие показатели продуктивности биомассы могут быть объяснены тем, что в мембранных фотобиореакторах происходит эффективное перемешивание и распределение потоков необходимых для роста микроводорослей элементов.

Таблица 1

Тип биореакторов и используемые в них культуры микроводорослей

Реактор, объем	Культура	Продукция микроводорослей, мг/(л·сут)	Литературный источник
Колонный, 16,9 л	<i>Scenedesmus sp.</i>	128	[54]
Осмोटический мембранный фотобиореактор, 5,5 л	<i>Chlorella vulgaris</i>	11,94	[55]
Мембранный фотобиореактор, 5,5 л	<i>Chlorella vulgaris</i>	18,07	[55]
Прямоугольный стеклянный фотобиореактор, 40 л	<i>Actinastrum, Scenedesmus,</i>	26,67	[67]
Открытые пруды (емкости), 40 л	<i>Chlorella, Spirogyra,</i>	50,00	[67]
Стеклянные емкости Ругех Роух, 1 л	<i>Nitzschia, Micractinium,</i>	47,06	[67]
Стеклянные емкости Ругех Роух, 1 л	<i>Golenkinia, Chlorococcum,</i>	11,76	[67]
	<i>Closterium, Euglena</i>		
Высокопродуктивные водорослевые пруды	<i>Stigeoclonium tenue</i>	1,65–1,95	[53]
Высокопродуктивные водорослевые пруды	<i>Phormidium sp. Oocystis</i>	0,33	[7]
	<i>Microspora</i>		
Круговой канальный открытый ФБиО, 700 л	<i>Scenedesmus sp.</i>	0,4–1,7	[52]
Турбидостатный открытый ФБиОР1	<i>Dunaliella tertiolecta;</i>	1,5	[10]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		
Высокопродуктивные водорослевые пруды	<i>Pediastrum boryanum</i>	0,6–3,3	[40]
	<i>to Dictyosphaerium sp.</i>		
	<i>Micractinium sp.</i>		
Колонный ФБиО	<i>Chlorella sorokiniana,</i>	135–206	[62]
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>		

Мембранный фотобиореактор	<i>Chlorella vulgaris</i>	131–2530	[37]
Мембранный фотобиореактор	<i>Chlorella emersonii</i>	35	[37]
Мембранный фотобиореактор	<i>Chlorella sp.</i>	55	[37]
Мембранный фотобиореактор	<i>Scenedesmus sp.</i>	4	[37]

Одним из наиболее распространенных способов культивирования микроводорослей являются высокопроизводительные открытые пруды (HARP – high rate algal ponds/photobioreactors) и абсорбционные колонны для поглощения углекислого газа и сероводорода [см. 9]. Разрабатываются также ФБиОР по производству и очистке биогаза с двухступенчатой биологической системой, состоящей из: 1) анаэробного метантенка, работающего на смеси первичного осадка и избыточного активного ила очистных сооружений, и 2) ФБиОР, в котором очищается от CO₂ (за счет цианобактерий, например) полученный на первой стадии биогаз [18].

Наиболее перспективным для массового распространения являются панельные фотобиореакторы из-за простоты конструкции и обслуживания. Мембранный фотобиореактор позволяет получить максимальный прирост биомассы на единицу объема. Это объясняется тем, что именно эти реакторы дают возможность создать максимальную концентрацию «рабочей биомассы» микроводорослей и обеспечивают непрерывность подачи

питательного раствора в реактор. Максимальная рабочая концентрация биомассы в мембранных реакторах, в соответствии с имеющимися данными экспертов, – 8–10 г по сухому веществу (СВ) в 1 л [5]. Однако все сложные фотобиореакторы (такие как мембранные) смогут стать рентабельными только при высокой стоимости получаемого продукта из микроводорослей (биоактивные добавки, масла и др.).

Типы субстратов для выращивания микроводорослей

В таблице 2 представлены характеристики сточных промышленных вод, которые потенциально могут быть использованы для выращивания микроводорослей, а также оптимизированная искусственная питательная среда. Из этой таблицы видно, что наиболее пригодными являются стоки предприятий фармацевтической индустрии, отдельных химических производств, текстильной и пищевой промышленности. Показатели этих стоков наиболее близки по составу к оптимизированной искусственной среде для выращивания водорослей.

Таблица 2

Характеристики разных промышленных сточных вод

Тип предприятия промышленности	ХПК мг/л	БПК мг/л	NH ₄ -N мг/л	N мг/л	ρ мг/л	Взвешенные вещества, мг/л	рН	Литературный источник
Металлургия	150–6000	-	10–300	7-8	-	2500–5000	7–8	[34]
Фармацевтическая и химическая	240–35600	800–114000	<0,2	5–7500	8–4200	0,06–1679	1,0–6,7	[13, 34]
Текстильная	728–6000	250–700	4,8–100	21–57	0,83–120	16–46	7,8–10,4	[37]
Добывающая	-	-	-	0,2	0,23	-	4,2	[12]
Пищевая (оливковое масло)	-	-	-	410–1020	30–1000	41900–54760	4,9–5,1	[26]
Пищевая (обработка)	440–3500	132–16000	-	5,7–9,5	4–58	2,43–13300	6,35–7,0	[44]
Кожевенная	16000	5000	450	273	21	-	-	[42]
Ковровая	106–1412	2–487	0,57–25,85	-	3–13	4–268	6,5–8,0	[15]
Бумажная	1120–160	200–210	-	-	-	80–90	5,5–6,8	[20]
Молочная	10251	4840	-	663	153	5802	8,34	[19]
Сахарная	1360–2000	300–2200	-	-	-	220–790	6,5–8,8	[28]
Оптимизированная искусственная среда	-	-	-	270–550	59–128	-	7,0–8,5	[1]

Примечание: «-» – данные отсутствуют

Для построения экономически целесообразной модели производства биогаза огромную роль играет доступ к дешевому сырью получения биомассы. Такими источниками сырья могут быть: бытовые сточные воды; органические отходы сельского хозяйства; лигноцеллюлозные отходы; дешевые сельскохозяйственные культуры; биомасса микроводорослей, выращенных специально для получения биогаза.

Зависимость выхода биогаза от источника питательных веществ показана в таблице 3. Самыми продуктивными источниками для культивирования биомассы микроводорослей (см. табл. 3) являются стоки сельско-

хозяйственных комплексов (например, свиноводческих) и городских бытовых сточных вод (разной степени обработки). Кроме неочищенных бытовых сточных вод, часто используется сток после первичной и вторичной очистки. Существуют исследования, доказывающие возможность получения энергии при очистке загрязненных вод пищевой (белковые отходы, отходы алкогольного производства, отходы мельниц для размолки масличных культур и горчичных фабрик, мясокомбинаты), фармацевтической (включая пенициллин и стероиды), целлюлозно-бумажной, текстильной и нефтехимической промышленности с применением водорослей [см. 34, 45].

Таблица 3

Зависимость выхода биогаза и продуктивности микроводорослей от типа субстрата (источника питательных веществ для микроводорослей)

№ п/п	Выход биогаза мл CH ₄ / (л·сут)	Продуктивность микроводорослей, мг/(л·сут)	Источник питательных веществ	Литературный источник
1	185–261	20,0–136,6	Неочищенные городские сточные воды	[41]
2	-	128,8	Неочищенные стоки свиной фермы	[54]
3	-	26,7	Неочищенные разбавленные (10%) сточные воды молочной фермы	[67]
4	-	50	Неочищенные разбавленные (25%) сточные воды молочной фермы	[67]
5	0,63	0,33	Активный ил аэротенка	[8]
6	84–217	-	Городские сточные воды	[23]
7	25–571	-	Обработанные энзимами городские сточные воды	[35]
8	1170	-	Суспензия водорослей + бумажные отходы	[69]
9	80–145	-	Бытовой сток после третичной очистки	[24]
10	-	39,9–131,7	Сток после вторичной очистки бытовых сточных вод	[33]
11	-	60	Искусственная питательная среда для фотобиореактора	[33]
12	-	4	Обработанный сток после очистки производственных стоков с добавлением питательных веществ	[33]
13	-	2530	Неочищенные бытовые стоки	[33]
14	-	42,6	Сельскохозяйственные сточные воды (до очистки)	[33]

Примечание: «-» — данные отсутствуют

Использование микроводорослей для получения биогаза подразумевает меньшую территориальную зависимость от источника сырья, чем для сельскохозяйственных культур и лигноцеллюлозных остатков [см. 11]. Одна из простых схем использования водорослей для получения биогаза описана Collet P. et al. [16] и приведена на рисунке 1.

На рост водорослей оказывает влияние множество факторов — от уровня перемешивания и газообмена до содержания питательных веществ. Одним из главных условий служит достаточное количество азота и фосфора. Именно возможность потреблять и усваивать эти два элемента определяется как уровнем роста культуры микроводорослей, так и качественным составом биомассы.

поглощения питательных элементов от освещения. В частности, от изменения цикла «ночь-день»: при искусственном увеличении темной части цикла ночь-день в 5 раз замедляется уровень поглощения азота в 2,3 раза, фосфора — в 2 раза, уменьшается содержание хлорофилла в 3 раза; уровень ХПК уменьшается также в 2 раза [30].

Чаще всего эффективность культивирования в экспериментах определяется по приросту биомассы — в мг/(л·сут).

Концентрация биомассы рассчитывается, в том числе, по общему углероду и углекислому газу [см. 54]:

$$C_{(мг/л)} = \frac{[(CO_{2i} - CO_{20}) + (TOC_i - TOC_0) + (TIC_i - TIC_0)] / FCM}{WV}$$

где CO_2 — количество углекислого газа, ТИС — количество общего неорганического углерода, ТОС — количество общего органического углерода, потребленные между временем t_0 и t_i ; WV — общий рабочий объем реактора; FCM — коэффициент содержания углерода в биомассе (0,5137).

Но в некоторых случаях концентрация биомассы рассчитывается по концентрации хлорофилла (а) в клетке. Содержание хлорофилла рассчитывается по следующей формуле [46]:

$$\text{Хлорофилл а (мкг/л)} = V[11,64(OD_{663} - OD_{750}) - 2,16(OD_{645} - OD_{750}) + 0,1(OD_{630} - OD_{750})]$$

где V — объем экстракции (мл), OD_k — оптическая плотность при длине волны k (определяется специальными методами мониторинга — [38, 50]).

Поскольку существует прямая зависимость между биомассой и содержанием хлорофилла в биомассе, то с построением калибровочных графиков этой зависимости возможно получить данные по биомассе, исходя из прямого измерения хлорофилла, что менее трудоемко, чем измерение биомассы [2–4, 39]. При этом необходимо учитывать, что в данном случае определяется лишь собственно биомасса водорослей, а не сумма органического вещества, которое поступает из реактора (включая детрит и коллоидные частицы).

Зависимость прироста биомассы от уровня рН показана в таблице 4, в которой приводятся данные из экспериментов, осуществленных в разных условиях. Нужно отметить, что рН в рассматриваемых источниках не являлся ключевым фактором прироста биомассы, поэтому четкой зависимости между уровнем роста и рН без учета остальных факторов не наблюдалось.

Таблица 4

Зависимости прироста биомассы от значения рН

№ п/п	Прирост биомассы водорослей, мг/(л·сут)	рН	Литературный источник
1	98	8,6–10,8	[41]
2	131	8,6–10,8	[41]
3	136	8,6–10,8	[41]
4	20	8,6–10,8	[41]
5	27	8,6–10,8	[41]
6	46	8,6–10,8	[41]
7	128	7,9	[54]
8	1,65–1,95	7,9–8,1	[53]
9	0,33	8,1	[7]
10	1,3	9	[52]
11	1,7	8	[52]
12	1,4	7	[52]
13	1,1	9	[52]
14	1,2	8	[52]
15	1,3	7	[52]
16	0,4	8	[52]
17	0,4	8	[52]
18	0,5	8	[52]
19	27,4–49,7	7,4	[6]
20	41–93	6,8	[6]

Очистка сточных вод в ФБиОР

Культивирование микроводорослей можно осуществлять на бытовых сточных водах. При этом может быть построена схема культивирования-очистки, как с добавлением осветленной (после первичных отстойников) биологически очищенной (после вторичной очистки) и доочищенной сточной воды (после блока доочистки). Сбраживание биомассы микроводорослей может проводиться с добавлением как первичного осадка, так и обезвоженного активного ила. При оптимизации схемы очистки путем добавления ФБиОР в классическую схему очистки активным илом можно достичь очень высокой степени удаления ХПК и азота [21].

При использовании микроводорослей в очистке сточных вод концентрация водорослевой биомассы меняется на разных этапах культивирования в зависимости от конструкции ФБиОР. В случае с мембранными фотобиореакторами максимальная концентрация биомассы устанавливается на 12–18-й день, а после — уменьшается. Характерный график можно видеть на рисунке 2 применительно к сточным водам с постоянными концентрациями NH_4-N (4 мг/л), NO_3-N (0,35 мг/л), PO_4-P (1,75) мг/л [см. 55]. Первый ФБиОР, данные

по которому представлены на рисунке 2, являлся мембранным фотобиореактором с обратным осмосом, второй — мембранным фотобиореактором с микрофильтрацией.

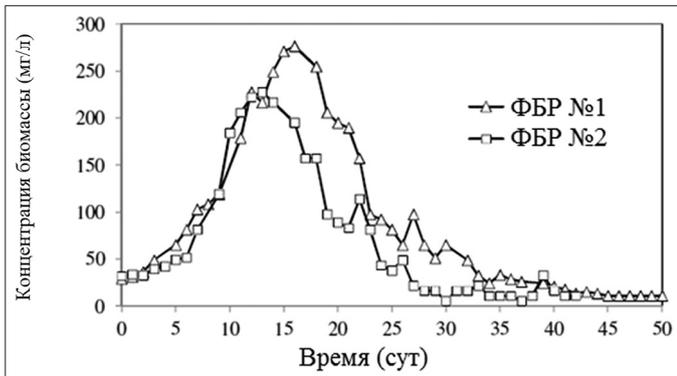


Рис. 2. Варьирование концентрации биомассы в фотобиореакторе с течением времени культивирования [см. 55]

Наиболее эффективными для очистки сточных вод являются водоросли *Clorella vulgaris* и циано-

бактерии *Aphanizomenon ovalisporum* и *Anabaena planctonica* — они обнаруживают наиболее высокие результаты как роста (за 8 дней — 0,42; 0,71; 0,71 г/л), так поглощения азота из сточных вод (за 4 дня — 100%; 95%; 93%) и выхода биогаза (184; 218; 261 мл $\text{CH}_4/\text{л}\cdot\text{сут}$) [41].

В ФБиОР, очищающем сточные воды, всегда присутствует бактериально-водорослевый биоценоз. В зависимости от отношения числа клеток бактерий к числу клеток водорослей изменяется уровень поглощения азота и фосфора. При доминировании водорослей в составе биомассы уровень поглощения общего азота увеличивается в 5 раз, общего фосфора — в 4 раза. В бактериально-водорослевом биоценозе, кроме ассимиляции биогенных элементов в биомассу, протекают процессы нитрификации-денитрификации. Направления процессов преобразования форм азота при очистке сточных вод биомассой микроводорослей показаны на рисунке 3 [7].

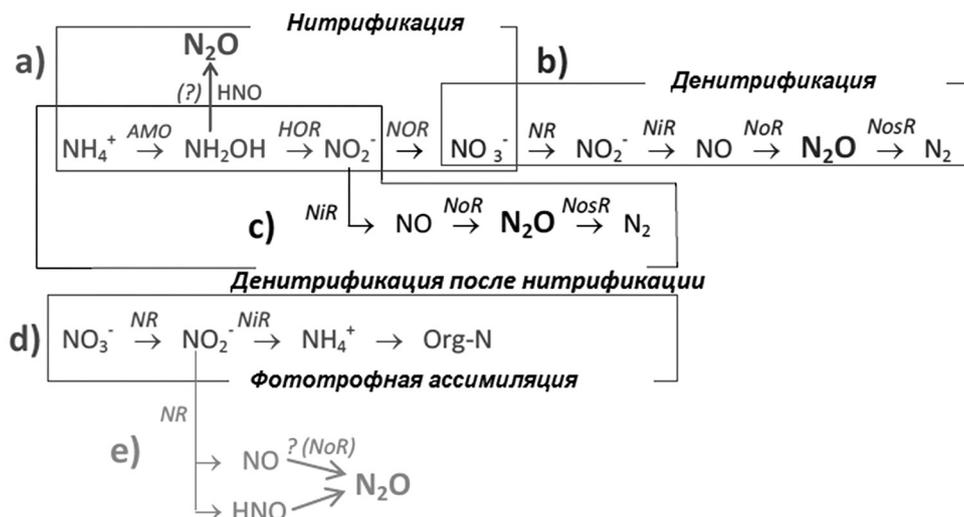


Рис. 3. Схема нитрификации при очистке сточных вод водорослями [7], где: AMO — аммоний-монооксигеназа; HNO — нитроксил; HOR — гидроксиламиноксиредуктаза; NOR — нитритоксиредуктаза; NR — нитратредуктаза; NiR — нитритредуктаза; NoR — нитриоксиредуктаза; NosR — азотооксида редуктаза; NO — оксид азота

Зависимости удаления азота и фосфора от удельного роста водорослей показаны на рисунке 4а и рисунке 4б [по данным 6, 33, 52, 62]. Эффективность удаления азота не имеет видимой зависимости от роста биомассы водорослей. Это объясняется тем, что удаление азота в смешанной бактериально-водорослевой культуре (где ассимиляция в биомассу не является единственным процессом очистки воды) осуществляется также за счет взаимосвязанных процессов аммонификации, нитрификации, денитрификации, которые изменяют эффективность очистки по азоту в ту или иную сторону.

Для фосфора прослеживается закономерность: при удельном росте водорослей более 50 мг/(л·сут) эффективность снижения его концентрации всегда более 90%. Это происходит потому, что при активном росте водорослей рН увеличивается до 10–11, а при рН более 9 всегда процесс осаждения малорастворимых фосфатов становится более значимым, чем процесс ассимиляции фосфора в биомассу водорослей. То есть, большая часть удаляемого фосфора — это сорбированные на микроводорослях малорастворимые фосфаты.

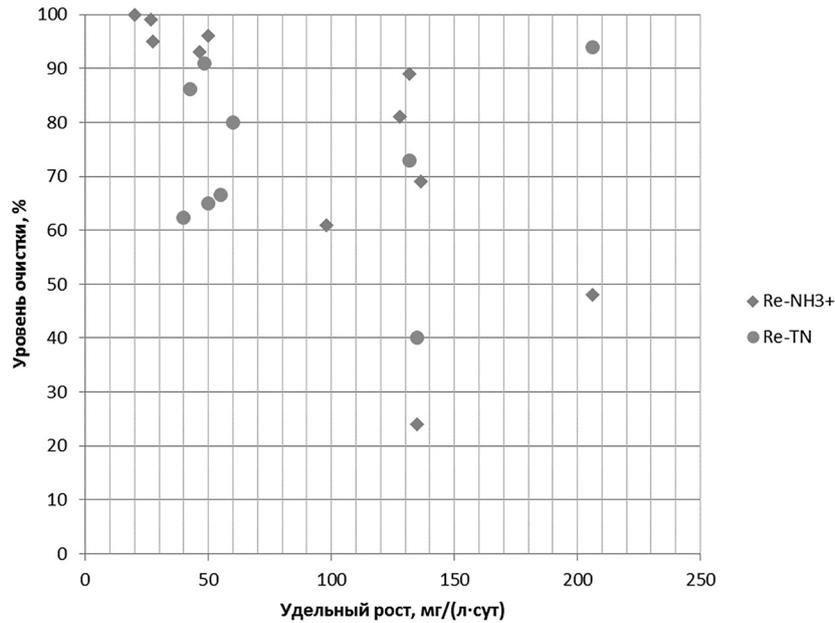


Рис. 4а. График зависимости удаления азота от удельного роста микроводорослей:
 Re-NH₃₊ – удаление азота аммонийного, Re-TN – удаление общего азота

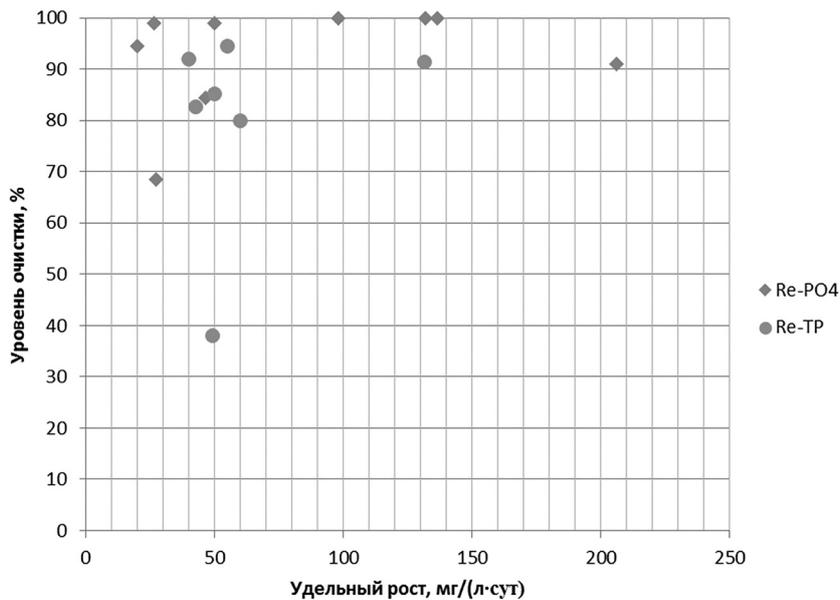


Рис. 4б. График зависимости удаления фосфора от удельного роста микроводорослей:
 Re-PO₄ – удаление фосфатов, Re-TP – удаление общего фосфора

Производство биотоплива из микроводорослей

Для получения биогаза необходимо соблюдать ряд условий. Например, для анаэробного брожения – это температура (20–40 градусов), pH (6,8–7,0) [14], содержание органического вещества при запуске реактора (20 мг/л) [53], время прохождения цикла (13–100 дней) [61], щелочность (содержание солей, создающих динамический баланс pH), соотношение углерод/азот [21].

У водорослей соотношение C/N ниже, чем у сточных вод или первичного осадка сточных бытовых

вод, что сказывается на низком выходе биогаза. Добавление сточных вод к биомассе водорослей позволяет увеличить соотношение C/N с 6–8 до 12–30. Оптимальное соотношение водорослей и сточных вод (по массе) 1/1 – 1/3, соответственно. Для метаногенеза наилучшим вариантом является смесь водорослей с осветленными водами, так как в этом случае водоросли сорбируют жирные кислоты из поступающей воды. Зависимость выхода биогаза от соотношения C/N показана в таблице 5.

Таблица 5

Зависимость выхода биогаза от соотношения углерод/азот в водорослевом субстрате [69]

Соотношение водорослей (В) и сточных вод (С)	C/N	мл CH ₄ /(л·сут)
1:0	6,7	573
1:4	11,8	968
1:2	18,0	1170
2:0	6,7	180
2:1	13,3	823
1:1	18,0	1170
2:3	22,6	1607
1:2	27,2	8560

Важно заметить, что при увеличении соотношения C/N растет удельный выход биогаза на поглощаемую единицу азота. Показатель удельного высвобождения аммиака на единицу получаемого биогаза (метана) составляет от 0,05 до 0,08 для чистой культуры микроводорослей (C/N=2-5), 0,01–0,08 для смеси активного ила с водорослями (C/N=5–13) и от 0,01 до 0,05 для обогащенных органикой отходов (C/N=0,0–0,04) [24].

Для увеличения выхода биогаза возможно использовать предварительную обработку биомассы водорослей, как физическую (термическая, паровая, механическая, ультразвуковая), химическую (кислотный

гидролиз), так и биологическую (добавление нескольких типов осадков сточных вод). При такой предварительной обработке выход биогаза увеличивается до 380 л/кг СВ. Для сравнения: если в качестве источника использовать навоз, то можно получить уровень выхода биогаза не более 300 л/кг СВ [31, 66].

Если конечной целью является получение биогаза, то при совместном анаэробном сбраживании биомассы, богатой азотом (водоросли), и субстрата из сточных вод (например, осветленных) можно получить конкурентные результаты по выходу биогаза — до 1000 л/кг СВ, содержащего 39% CO₂ и 61% CH₄ [59]. При этом должно выдерживаться определенное соотношение C/N — не менее 20, в противном случае может иметь место уменьшение выхода биогаза [24, 63].

Микроводоросли могут быть утилизированы для получения другого биотоплива, в частности, биодизеля (через промежуточную стадию трансэстерификации биомасла из водорослей). Преимущество использования микроводорослей в том, что большинство отходов (такие как загрязненная вода, углекислый газ) утилизируется биомассой. Одна из концепций такой схемы была представлена Zhu L.D. et al. [70]. В ней эффективно повторно используется углекислый газ и сточные воды. Микроводоросли берут необходимые для роста элементы, в частности, азот и фосфор, из сточных вод (рис. 5).

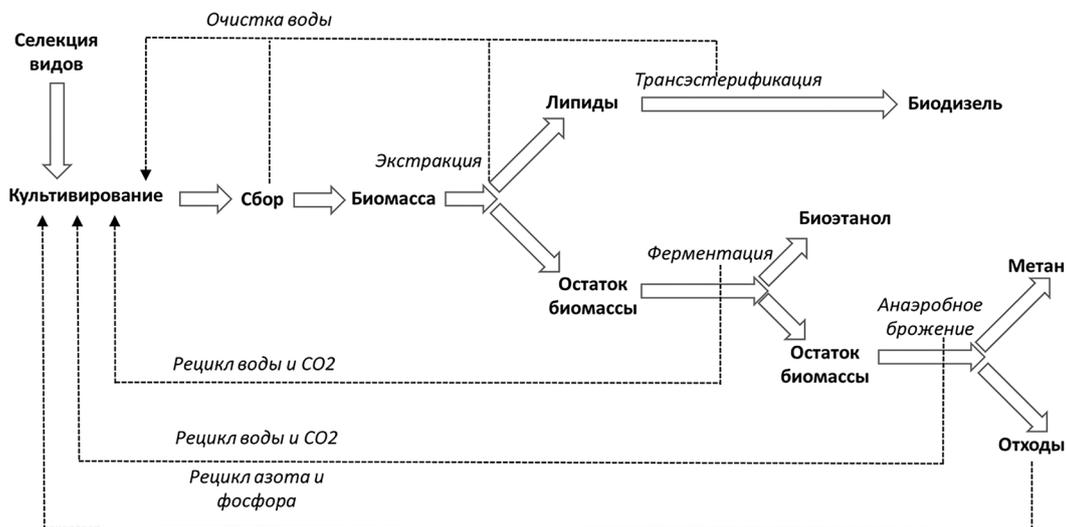


Рис. 5. Схема производства биодизеля и биогаза при культивировании микроводорослей

Инновации при применении микроводорослей

Помимо того, что из микроводорослевой биомассы продуктов можно получать биогаз, они могут использоваться для непосредственной очистки биогаза, добытого из других источников. Это применимо также и для обычного (природного) газа [24].

По данным литературы, сероводород с концентрацией 150–3000 ppm(v) был успешно удален микроводорослями в ФБиР в течение трех дней [см. 9]. Также сообщается, что концентрации аммония в биогазе до 36 мг/л N-NH₃ удалялись группой микроводорослей, которая была предварительно адаптирована для роста при

высокой концентрации аммоний-иона [17]. Получается, что микроводорослевые сообщества способны очищать биогаз от углекислого газа, сероводорода, аммония и увеличивать содержание в нем кислорода. К сожалению, итоговая концентрация метана (до 64%) оказывается недостаточно высокой, чтобы соответствовать нормам биотоплива (от 85%) по европейским топливным регламентам для использования в двигателях современных машин [43, 54].

Перспективными являются три направления разработок по очистке и улучшению биогаза:

1. GPP® — качественное улучшение криогенного биогаза потоками чистого углекислого газа. Такая разработка рекомендуется для сжиженного биогаза.
2. ВАВU (Bottom Ash for Biogas Upgrading — Зола для улучшения биогаза) — использование остатков зольной массы твердых бытовых отходов в качестве сорбента для очистки биогаза.
3. Biogas-ALG — технология очистки биогаза бикарбонатом натрия. Микроводоросли преобразуют бикарбонат в растворимую карбонатную форму, которая обогащается углекислым газом и возвращается обратно в цикл для питания водорослей [11, 27].

Эффективность очистки сточных вод можно повысить облучением биомассы микроводорослей ультрафиолетом (интенсивность облучения 189,3–1892,7 мВт·с·см⁻²). Например, такая обработка увеличивала рост водорослей (*Chlorella*) на отходах молочного производства с большим содержанием свободных жирных кислот на 100% за 10 дней культивирования [47].

При наличии в составе сточных вод биоразлагаемых полимеров, например, полигидроксиалканатов, таких как поли(3-гидроксибугурат), возможно увеличить питательную базу для цианобактерии и водорослей, что позволит увеличить выход биогаза до 11% [49]. К тому же применение такого материала позволяет получить более качественный биогаз — с содержанием метана на 3% выше, чем при обычном сбраживании [64].

Применение предварительно замороженных (-20 °С на 1 час) микроводорослей *Chlorella vulgaris* для очистки сточных вод животноводческого комплекса дает возможность увеличить эффективность удаления ХПК на выходе на 50–235% [48].

Новое направление в производстве биогаза — добавление некоторого количества органических веществ к содержимому микроводорослевого метантенка. Например, внесение соевого масла в соотношении 0,5/36 к микроводорослям может увеличить выход биогаза на

420% до 0,38 мл СН₄/(мл·сут). Внесение глицерина в соотношении 0,082/36 увеличивает выход биогаза на 323% до 0,40 мл СН₄/(мл·сут) по сравнению с контрольными образцами с чистым водорослевым субстратом [60].

Использование ФБиоР в архитектуре

В последнее время появляется множество необычных вариантов конструкции фотобиореакторов для культивирования микроводорослей. Такие «живые» конструкции выглядят привлекательно, что позволяет использовать их в современной архитектуре.

Одним из главных требований к конструкции ФБиоР является наличие источника света. Все архитектурные конструкции с фотобиореакторами представляют собой либо малые архитектурные формы, либо части зданий. Самое распространенное решение для применения живой культуры — оформление фасадов из фотобиореакторных панелей. В зданиях водоросли всегда будут находиться под воздействием света — днем естественного, а ночью искусственного (ведь общественные здания требуют постоянного освещения). Фотобиореакторные панели необходимо ставить под определенным углом — для наиболее эффективной инсоляции. Для микроводоросли *Chlorella vulgaris* — это 45°. Оптимальное для роста время пребывания микроводорослей в подобном реакторе — от 24 до 44 часов. Такие решения позволяют минимизировать энергетические потери, если реакторы с водорослями служат для получения биогаза. С помощью изменения концентрации микроводорослей возможно изменять уровень светопрозрачности внутри здания — в зависимости от времени суток [56, 57].

Такие спроектированные здания можно увидеть уже сейчас (рис. 6А–В) [22, 58, 68].

Основные типы применяемых фотобиореакторов — трубчатые (колонные) и панельные. Трубчатые различаются по толщине и объему и в силу конструктивных особенностей не закрывают 100% поверхности здания. В панельных реакторах легче регулируются светопрозрачность, наполнение, и они могут закрывать всю поверхность полностью. Для «оживления» реакторов и перемешивания в любой фотобиореактор необходимо подавать углекислый газ (или другую газовую смесь). Огромным преимуществом является то, что такие встроенные фотобиореакторы способны использовать сточные воды здания (в качестве источника азота и фосфора) и очищать воздух (потреблять углекислый газ и выделять кислород) [см. 58]. Таким образом, использование ФБиоР в архитектуре — это шаг в сторону создания автономных жилых сооружений без отходов.



А



Б

В

Рис. 6. Спроектированные здания с использованием ФБиОР: А – Администрации общих служб в Лос-Анжелесе, США [58]; Б – Гелиотроф в Шварцвальде, Германия [68]; В – BIQ Building в Гамбурге, Германия [22]

Заключение

Таким образом, микроводоросли становятся важным сырьем для получения биотоплива (в первую очередь метана) в мире и позволяют очищать и доочищать сточные воды. Кроме того, фотобиореакторы становятся элементами современной городской архитектуры, что делает жилые здания автономными – со своими собственными очистными сооружениями для сточных вод и воздуха внутри зданий. Технические решения по созданию разных типов фотобиореакторов развиваются. Самыми продуктивными источниками для культивирования биомассы микроводорослей служат стоки сельскохозяйственных комплексов (например, свиноводческих) и городских бытовых сточных вод. В ФБиОР, очищающем сточные воды, всегда присутствует бактериально-водорослевый биоценоз, в котором протекают процессы нитрификации-денитрификации. Процесс удаления фосфора в ФБиОР больше зависит от рН среды, который определяется скоростью прироста биомассы.

Для увеличения выхода биогаза из микроводорослей возможно использовать предварительную обработку биомассы водорослей: физическую (термическая, паровая, механическая, ультразвуковая), химическую (кислотный гидролиз) и биологическую (добавление нескольких типов осадков сточных вод).

Работа выполнена по гранту РФФ (№ 17-17-01204 от 25.04.2017).

Литература

1. Карякин Д.О. и др. Оптимизация питательной среды для культуры *Scenedesmus* sp. // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – № 8–2(62). – С. 10–15.
2. Козлов М.Н., Рубин А.Б., Щеголькова Н.М., Маторин Д.Н., Шашкина П.С., Осипов В.А. Флуоресцентные методы мониторинга процесса получения биомассы из микроводорослей // Водоснабжение и санитарная техника. – 2011. – Т. 1. – № 9. – С. 9–14.
3. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Люминесценция хлорофилла в культурах микроводорослей и природных популяциях фитопланктона // Итоги науки и техн. ВИНТИ. Сер. Биофизика. – 1990. – Т. 40. – С. 49–100.
4. Рубин А.Б. Биофизика фотосинтеза и методы экологического мониторинга // Технология живых систем. – 2005. – Т. 2. – С. 47–68.
5. Харьковина О.В. Эффективная эксплуатация и расчет сооружений биологической очистки сточных вод. – Волгоград: изд-во «Панорама», 2015. – 433 с.
6. Abdelaziz A.E.M. et al. Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production // Bioresource Technology. – 2014. – Vol. 157. – P. 140–148.
7. Alcántara C., García-Encina P.A., Muñoz R. Evaluation of the simultaneous biogas upgrading and treatment of centrates in a high-rate algal pond through C, N and P mass balances // Water Science and Technology. – 2015. – Vol. 72. – No. 1. – P. 150–157.
8. Alcántara Pollo C. et al. Evaluation of the performance and sustainability of algal-bacterial processes during wastewater treatment using a mass balance approach // Bioresource Technology. – 2015. – Vol. 191. – P. 173–186.
9. Bahr M., Diaz I., Dominguez A., Gonzalez Sanchez A., Munoz R. Microalgal biotechnology as a platform for an integral biogas upgrading and nutrient removal from anaerobic effluents // Environ. Sci. Technol. – 2014. – Vol. 48. – P. 573–581.
10. Barbosa M.J. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation. Ph.D. Dissertation. – Wageningen, The Netherlands: Wageningen University, 2003.
11. Budzianowski W.M. A review of potential innovations for production, conditioning and utilization of biogas with multiple-criteria assessment // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2016. – Vol. 54. – P. 1148–1171.
12. Cai T., Park S.Y., Li Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2013. – Vol. 19. – P. 360–369.
13. Chen G., Zhao L., Qi Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: a

- critical review // *Applied Energy*. — 2015. — Vol. 137. — P. 282–291.
14. Cheng X.-Y., Zhong C. Effects of feed to inoculum ratio, co-digestion, and pretreatment on biogas production from anaerobic digestion of cotton stalk // *Energy & Fuels*. — 2014. — Vol. 28. — P. 3157–3166.
 15. Chinnasamy S. et al. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications // *Bioresource Technology*. — 2010. — Vol. 101. — No. 9. — P. 3097–3105.
 16. Collet P., Hélias A., Lardon L., Ras M., Goy R.A., Steyer J.P. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production // *Bioresour. Technol.* — 2011. — Vol. 102(1). — P. 207–214.
 17. Collos Y., Harrison P.J. Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae // *Mar. Pollut. Bull.* — 2014. — Vol. 80. — P. 8–23.
 18. Converti A., Oliveira R.P.S., Torres B.R., Lodi A., Zilli M. Biogas production and valorization by means of a two-step biological process // *Bioresour. Technol.* — 2009. — Vol. 100. — P. 5771–5776.
 19. Cristian O. et al. Characteristics of the untreated wastewater produced by food industry // *Analele Universității din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului*. — 2010. — Vol. 15. — P. 709–714.
 20. Devi N.L. et al. Physicochemical characteristics of paper industry effluent sea case study of South India Paper Mill (SIPM) // *Environmental Monitoring and Assessment*. — 2011. — Vol. 177. — No. 1–4. — P. 23–33.
 21. Ebrahimian A., Kariminia H.-R., Vosoughi M. Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater // *Renew. Energy*. — 2014. — Vol. 71. — P. 502–508.
 22. Elrayies G.M. Microalgae: Prospects for greener future buildings // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. — 2018. — Vol. 81. — P. 1175–1191.
 23. González-Fernández C. et al. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass // *Biomass and Bioenergy*. — 2012. — Vol. 40. — P. 105–111.
 24. Hidaka T. et al. Growth and anaerobic digestion characteristics of microalgae cultivated using various types of sewage // *Bioresource Technology*. — 2014. — Vol. 170. — P. 83–89.
 25. Holm-Nielsen J.B., Al Sadi T., Oleskowicz-Popiel P. The future of anaerobic digestion and biogas utilization // *Bioresour. Technol.* — 2009. — Vol. 100(22). — P. 5478–5484.
 26. Ji M.K. et al. Effect of mine wastewater on nutrient removal and lipid production by a green microalga *Micratinium reiseri* from concentrated municipal wastewater // *Bioresour. Technol.* — 2014. — Vol. 157. — P. 84–90.
 27. Kampanatsanyakorn K. Upgrading of biogas to marketable purified methane exploiting microalgae farming. Patent no. WO2013/034947A1; 2013.
 28. Kolhe A.S., Sarode A.G., Ingale S.R. Study of effluent from sugar cane industry // *Sodh Samiksha Mulyankan*. — 2009. — Vol. 2. — P. 303–306.
 29. Krustok I. et al. Inhibition of nitrification in municipal wastewater-treating photobioreactors: Effect on algal growth and nutrient uptake // *Bioresource Technology*. — 2016. — Vol. 202. — P. 238–243.
 30. Lee C.S. et al. Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater // *Water Research*. — 2015. — Vol. 68. — P. 680–691.
 31. Li D. et al. Effects of feedstock ratio and organic loading rate on the anaerobic mesophilic co-digestion of rice straw and pig manure // *Bioresource Technology*. — 2015. — Vol. 187. — P. 120–127.
 32. Li R. et al. Anaerobic codigestion of kitchen waste with cattle manure for biogas production // *Energy & Fuels*. — 2009. — Vol. 23. — No. 4. — P. 2225–2228.
 33. Luo Y., Le-Clech P., Henderson R.K. Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: a review // *Algal Research*. — 2017. — Vol. 24. — P. 425–437.
 34. Ma Q. et al. Bacterial community compositions of coking wastewater treatment plants in steel industry revealed by Illumina high-throughput sequencing // *Bioresource Technology*. — 2015. — Vol. 179. — P. 436–443.
 35. Mahdy A., Ballesteros M., González-Fernández C. Enzymatic pretreatment of *Chlorella vulgaris* for biogas production: influence of urban wastewater as a sole nutrient source on macromolecular profile and biocatalyst efficiency // *Bioresource Technology*. — 2016. — Vol. 199. — P. 319–325.
 36. Marchello A. E. et al. Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium // *Brazilian Journal of Microbiology*. — 2015. — Vol. 46. — No. 1. — P. 75–84.
 37. Mascolo G. et al. Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment // *Bioresource Technology*. — 2010. — Vol. 101. — No. 8. — P. 2585–2591.
 38. Matorin D.N., Antal T.K., Ostrowska M., Rubin A.B., Ficek D., Majchrowski R. Chlorophyll fluorometry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae // *Oceanologia*. — 2004. — Vol. 46(4). — P. 519–531.
 39. Matorin D.N. Fluorescence methods of the photosystem II activity biomonitoring in phytoplankton // *Biophysics*. — 2000. — Vol. 45. — No. 3. — P. 479–482.
 40. Mehrbadi A., Craggs R., Farid M.M. Biodiesel production potential of wastewater treatment high rate algal pond biomass // *Bioresource Technology*. — 2016. — Vol. 221. — P. 222–233.
 41. Mendez L. et al. Comparison of *Chlorella vulgaris* and cyanobacterial biomass: cultivation in urban wastewater and

- methane production // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. — 2016. — Vol. 39. — No. 5. — P. 703–712.
42. *Mutamim N.S.A. et al.* Membrane bioreactor: Applications and limitations in treating high strength industrial wastewater // *Chemical Engineering Journal*. — 2013. — Vol. 225. — P. 109–119.
 43. *Neshat S. A. et al.* Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. — 2017. — Vol. 79. — C. 308–322.
 44. *Ntougias S. et al.* The effects of olives harvest period and production year on olive mill wastewater properties — evaluation of *Pleurotus* strains as bioindicators of the effluent's toxicity // *Chemosphere*. — 2013. — Vol. 92. — No. 4. — P. 399–405.
 45. *Pandey P. et al.* Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery // *Applied Energy*. — 2016. — Vol. 168. — P. 706–723.
 46. *Pankratz S. et al.* Algae production platforms for Canada's northern climate // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. — 2017. — Vol. 80. — P. 109–120.
 47. *Passero M.L. et al.* Ultraviolet radiation pre-treatment modifies dairy wastewater, improving its utility as a medium for algal cultivation // *Algal Research*. — 2014. — Vol. 6. — P. 98–110.
 48. *Passos F. et al.* Biogas production from microalgae grown in wastewater: effect of microwave pretreatment // *Applied Energy*. — 2013. — Vol. 108. — P. 168–175.
 49. *Philip S., Keshavarz T., Roy I.* Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. — 2007. — Vol. 82. — No. 3. — P. 233–247.
 50. *Pogosyan S.I., Kazimirko Yu.V., Matorin D.N., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B.* 2006. Russian Patent Application No. 2354958.
 51. *Politaeva N. et al.* *Chlorella microalga* biomass cultivation for obtaining energy in climatic conditions of St. Petersburg // *Energy Management of Municipal Transportation Facilities and Transport*. — Springer, Cham, 2017. — P. 555–562.
 52. *Posadas E. et al.* Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways // *Chemical Engineering Journal*. — 2015b. — Vol. 265. — P. 239–248.
 53. *Posadas E. et al.* Minimization of biomethane oxygen concentration during biogas upgrading in algal-bacterial photobioreactors // *Algal Research*. — 2015a. — Vol. 12. — P. 221–229.
 54. *Prandini J. M. et al.* Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. // *Bioresource Technology*. — 2016. — Vol. 202. — P. 67–75.
 55. *Praveen P., Heng J.Y.P., Loh K.C.* Tertiary wastewater treatment in membrane photobioreactor using microalgae: Comparison of forward osmosis & microfiltration // *Bioresource Technology*. — 2016. — Vol. 222. — P. 448–457.
 56. *Pruvost J. et al.* Microalgae culture in building-integrated photobioreactors: Biomass production modelling and energetic analysis // *Chemical Engineering Journal*. — 2016. — Vol. 284. — P. 850–861.
 57. *Pruvost J. et al.* Theoretical investigation of microalgae culture in the light changing conditions of solar photobioreactor production and comparison with cyanobacteria // *Algal Research*. — 2015. — Vol. 10. — P. 87–99.
 58. *Qiu F.* Algae architecture. — 2014. URL: <http://resolver.tudelft.nl/uuid:b0b6e05d-49d8-4cc0-9e28-f510b0a8b215>.
 59. *Sahu A.K., Siljudalen J., Trydal T., Rusten B.* Utilisation of wastewater nutrients for microalgae growth for anaerobic co-digestion // *J. Environ. Manag.* — 2013. — Vol. 122. — P. 113–120.
 60. *Salerno M., Nurdogan Y., Lundquist T.J.* Biogas production from algae biomass harvested at wastewater treatment ponds. An ASABE Conference Presentation. Paper Number: Bio098023. URL: https://digitalcommons.calpoly.edu/cenv_fac/180.
 61. *Salminen E., Rintala J.* Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste — a review // *Bioresource Technology*. — 2002. — Vol. 83. — No. 1. — P. 13–26.
 62. *Shchegolkova N. et al.* Microalgae cultivation for wastewater treatment and biogas production at Moscow wastewater treatment plant // *Water Science and Technology*. — 2018. — Vol. 77. — No. 6. — Feb 2018, wst2018088; doi: 10.2166/wst.2018.088.
 63. *Sialve B., Bernet N., Bernard O.* Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable // *Biotechnol. Adv.* — 2009. — Vol. 27. — P. 409–416.
 64. *Smith S.A. et al.* Toward sustainable dairy waste utilization: enhanced VFA and biogas synthesis via upcycling algal biomass cultured on waste effluent // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. — 2016. — Vol. 91. — No. 1. — P. 113–121.
 65. *Veal M.W. et al.* Algae for biofuels — economic and environmental costs. SRAC Publication No. 4310. — 2013.
 66. *Westerholm M., Hansson M., Schnürer A.* Improved biogas production from whole stillage by co-digestion with cattle manure // *Bioresource Technology*. — 2012. — Vol. 114. — P. 314–319.
 67. *Woertz I. et al.* Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock // *Journal of Environmental Engineering*. — 2009. — Vol. 135. — No. 11. — P. 1115–1122.
 68. *Wurm J.* Developing bio-responsive façades: BIQ house — the first pilot project // *Arup J.* — 2013. — Vol. 48(2) — P. 90–95.

69. Yen H.W., Brune D.E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane // *Biore-source Technology*. – 2007. – Vol. 98. – No. 1. – P. 130–134.
70. Zhu L.D., Hiltunen E., Antila E., Zhong J.J., Yuan Z.H., Wang Z.M. Microalgal biofuels: flexible bioenergies for sustainable development // *Renew Sustain. Energy Rev.* – 2014. – Vol. 30. – P. 1035–1046.

THE USE OF MICROALGAE BIOMASS FOR WASTEWATER TREATMENT AND BIOGAS PRODUCTION: PROBLEMS AND PROSPECTS

D.O. KARJAKIN¹, N.M. SCHEGOLKOVA^{1,2}

¹ *Institute of Water Problems of the Russian Academy of Sciences,*

² *Faculty of Soil Science of the Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Biogas, although it is a relatively new source of alternative energy, but undoubtedly has great prospects. Modern technical solutions make it possible to obtain biogas from waste generated from wastewater treatment. This has both advantages, for example, in the form of low prices for raw materials and obtained fuel, as well as disadvantages. New technological solutions that can increase biogas output, and, hence, economic return, are in demand right now. Recently, many options for raw materials for biogas have been proposed, but one of the most competitive is microalgae (obtained from sewage treatment plants), since this biomass (in contrast to activated sludge or agricultural waste) is a product of photosynthesis directly in the treatment plant reactor. This means that the carbon of biogas produced is a product of the conversion of carbon dioxide to methane directly at the treatment plant. This article analyzes various methods of using microalgae biomass in modern practice. This work is an overview of the most significant studies on several topics: 1) wastewater treatment with photobioreactors, 2) biogas production from microalgae biomass, 3) the use of microalgae in architecture. For these categories, a generalized analysis of the latest developments and basic technological solutions is given.

Keywords: microalgae, photobioreactors, methane, biogas, sewage treatment.

НЕМАТОДА *CAENORHABDITIS ELEGANS* КАК БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Г.В. ДЕМИДОВА*

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

В обзоре проанализированы возможности нематоды *Caenorhabditis elegans* как биологической модели для изучения патогенетических свойств холерного вибриона. Геном *C. elegans* секвенирован и содержит более 20000 генов, 60–80% из них гомологичны человеческим. Используя современные генетические и биоинформационные технологии, можно сравнительно быстро идентифицировать белки и молекулярные пути, включенные в патогенетические процессы. Для изучения взаимоотношений между *V. cholerae* и беспозвоночными хищниками водной среды нематода *C. elegans* является незаменимой естественной биологической моделью. Например, цитотоксин МАкА может способствовать распространению *Vibrio cholerae* в окружающей среде, обеспечивая выживание; его также можно рассматривать в качестве потенциального фактора вирулентности, способствующего инфицированию человека.

Ключевые слова: нематода, *Caenorhabditis elegans*, биологическая модель, патогенез холеры.

Молекулярные основы патогенности инфекционных агентов и соответствующие механизмы защиты хозяина от этих факторов изучаются на модельных системах. В последние десятилетия в качестве моделей для идентификации и изучения факторов вирулентности различных патогенных бактерий довольно широко используют беспозвоночные организмы. Авторы многочисленных экспериментальных работ и обзоров выделяют целый ряд преимуществ этих моделей и рассматривают их в качестве альтернативы традиционным моделям млекопитающих. Примером такой модели может служить нематода *Caenorhabditis elegans*.

Нематода *C. elegans* — свободноживущее многоклеточное беспозвоночное. В естественных условиях она паразитирует на многих видах бактерий [15, 25]. Для научных исследований был получен референтный штамм *C. elegans* N2 Bristol, который культивируют на специальной среде NGM с газоном кишечной палочки OP50 [26]. Нематода в качестве модельного организма имеет целый ряд преимуществ: легкость выращивания, короткое время генерации 3–4 дня, полностью секвенированный геном. Гермафродиты, составляющие большинство особей в популяции нематод, при оптимальной температуре вы-

ращивания (20–25 °С) продуцируют от 250 до 300 яиц за время генерации, возможность самооплодотворения приводит к образованию генетически гомогенной популяции. Время жизни нематод в лабораторных условиях — около 3 недель, за это время они проходят 4 стадии развития, которые отличаются только размерами. При неблагоприятных условиях из второй стадии переходят в стадию «dauer», в этом состоянии они не нуждаются в пище, устойчивы к высыханию и сохраняют жизнеспособность до 3 месяцев. Нематоды *C. elegans* могут быть заморожены в жидком азоте. Прозрачность этих организмов позволяет наблюдать за всеми стадиями их развития под световым микроскопом. Чтобы выявить функции генов, помимо использования делеций и мутаций, можно пометить ген флуоресцентным маркером и проследить за изменениями экспрессии генов. Преимуществом этой модели перед млекопитающими также является отсутствие этических проблем при работе с ними [26, 29].

К настоящему времени патогенные свойства огромного количества разнообразных бактерий были исследованы с использованием *C. elegans* [3, 27].

Одной из первых работ по изучению вирулентных свойств патогенных бактерий были эксперименты Tan et.al., которые показали, что *P. aeruginosa* может убивать *C. elegans* двумя способами — «slowkilling» (медленное убийство), «fastkilling» (быстрое убийство). При «slowkilling» микробы колонизируют кишечник нематоды и гибель наступает в течение нескольких дней (сокращается жизнь по сравнению с контролем кишеч-

© 2019 г. Демидова Г.В.

* Автор для переписки:

Демидова Галина Викторовна

канд. биол. наук, ст. научн. сотр. ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Email demidova.1954@bk.ru

ной палочкой *E. coli* OP50), при «fastkilling» нематода гибнет в течение нескольких часов под воздействием низкомолекулярных токсических веществ [27]. Модель *C. elegans* позволила просканировать большое количество мутантов с ослабленной вирулентностью и выявить гены, обуславливающие вирулентные свойства. Впоследствии установили, что многие из факторов вирулентности, связанные с гибелью червей, также принимают участие в патогенезе человека. Геном *C. elegans* секвенирован и содержит более 20000 генов, 60–80% из них гомологичны человеческим. Используя современные генетические и биоинформационные технологии, можно сравнительно быстро идентифицировать белки и молекулярные пути, включенные в патогенетические процессы [12, 18].

Ныне *C. elegans* используют для изучения факторов вирулентности особо опасных инфекций, к которым относится холерный вибрион. *Vibrio cholerae* проводит большую часть своего жизненного цикла за пределами хозяина-человека в прибрежных водоемах с географическим ареалом от тропиков до умеренных широт во всем мире. Способность вибриона выживать в различных экологических нишах требует адаптации к ряду меняющихся условий, включая температурные сдвиги, осмотический стресс, ограничения питательных веществ [17, 24]. Чтобы пережить эти неблагоприятные факторы, холерный вибрион использует различную стратегию: формирование биопленок на абиотических и биотических поверхностях, переход в жизнеспособное, но некультивируемое состояние, приобретение и хранение питательных веществ. Помимо абиотических факторов, биологические: хищники, такие как свободноживущие простейшие и нематоды, являются постоянной угрозой для бактерий в окружающей среде [10]. В ответ на биологические угрозы бактерии, в свою очередь, выработали защитные механизмы. Для изучения взаимоотношений между *V. cholerae* и беспозвоночными хищниками водной среды нематода *C. elegans* является незаменимой естественной биологической моделью.

Ключевыми детерминантами вирулентности *V. cholerae* являются холерный токсин (СТ) [31] и пили адгезии (ТСП) [11], но сейчас описан целый ряд дополнительных факторов, продуцируемых штаммами различных серогрупп. Эти штаммы могут вызывать заболевания с поражением желудочно-кишечного тракта различной степени тяжести [1, 2, 4]. Роль каждого в развитии заболевания остается недостаточно изученной. *C. elegans* оказалась идеальной моделью для понимания роли некоторых дополнительных факторов вирулентности у штаммов, лишенных холерного токсина и пилей

адгезии. В качестве дополнительных факторов вирулентности рассматривают экстрацеллюлярную протеазу PrtV и гемолизин VCC.

В 2006 году Vaitkevicius et al. обнаружили факт гибели нематоды *Caenorhabditis elegans* при высеве на штаммы *V. cholerae* различных серогрупп. Нематода погибала в течение 5 дней, тогда как на газоне референтного штамма *E. coli* OP 50 она сохраняла жизнеспособность в течение 2 недель. Гибель *C. elegans* зависела от регуляторов системы кворум-сенсинга. Делеция по *luxO* гену приводила к образованию гипервирулентных штаммов, *hapR* мутанты обладали ослабленной вирулентностью. Анализ мутантов, дефектных по генам кворум-сенсинга, позволил установить, что за гибель нематоды отвечает протеаза PrtV [29]. Впоследствии эти же авторы выделили и очистили протеазу из супернатанта клеток холерного вибриона [30]. Экстрацеллюлярная протеаза PrtV относится к семейству металлопептидаз M 6 с молекулярной массой 102 кДа, подвергается нескольким этапам процессинга, в результате которых образуются 2 активные формы с молекулярными массами 81 кДа и 73 кДа. Фермент относительно стабилен при низкой температуре и в присутствии ионов Са. Фермент разрушает важные элементы в плазме крови человека: пламиноген, фибриноген, фибриноектин [30]. Анализ взаимодействия протеазы PrtV с пламиногеном предполагает возможную роль фермента в изменении стабильности экстрацеллюлярного матрикса. Биологически активная PrtV выделяется системой секреции 2 типа в составе везикул наружных мембран и в таком виде разрушает амфипатический пептид LL-27 [21]. Таким образом, протеаза, возможно, обеспечивает устойчивость холерного вибриона к антимикробным пептидам, первому звену иммунного барьера неспецифической защиты человека от патогенов. Способность разрушать пептиды полезна холерному вибриону и при выживании в водной среде PrtV может быть тем фактором, который защищает микроб от поедания обитателями водоемов, такими как *Cafeteria roenbergensis* и *Tetrahymena puriformis* [17, 29, 30]. Протеаза холерного вибриона PrtV по своим биологическим свойствам может быть отнесена к факторам, которые необходимы и при развитии патогенетического процесса в организме человека, но также способствует выживанию *V. cholerae* в окружающей среде.

Гемолизин (HlyA) или цитолизин (VCC), кодируемый геном *hlyA*, относят к дополнительным факторам вирулентности холерного вибриона [7]. Свое название он получил за способность лизировать эритроциты млекопитающих, другое название цитолизин — характеризует его

способность вызывать деструкцию культивируемых клеток [34]. Это — типичный порообразующий токсин, который синтезируется в виде пробелка с молекулярной массой 80 кДа, затем в результате действия протеаз превращается в зрелую форму с молекулярной массой 65 кДа (подвергается двухэтапному процессингу, что приводит к образованию зрелой формы). В присутствии мембран, богатых холестеринном и церамидами, зрелый HlyA формирует гептамерные олигомеры, встраиваясь в мембраны, образует поры [19]. Образование таких трансмембранных пор приводит к гибели клеток либо путем генерации коллоидно-осмотического дисбаланса в клетках-мишенях [14], либо посредством индукции апоптоз-каспазозависимым способом [23]. На моделях *in vivo* препараты HlyA вызывали накопление жидкости в кишечнике кроликов и мышей-сосунков, выделение экссудатов и воспалительные процессы [23]. Оценку патогенетических свойств гемолизина провели на нематоде *C. elegans*. Было установлено, что гемолизин/цитотоксин ответственен за гибель нематоды, задержку развития и образование вакуолей в клетках кишечника. Повреждения, вызываемые гемолизином, в свою очередь, активируют гены врожденного иммунного ответа. На модели нематоды методом микрочипирования были определены гены, которые экспрессируются под воздействием гемолизина. Это гены лектинов С-типа, прионоподобные гены, гены, регулируемые инсулин/IGF-1 сигнальным путем и др. Ранее эти гены рассматривали в качестве медиаторов врожденного иммунитета у других бактерий [22]. Считают, что гемолизин является одним из дополнительных факторов вирулентности, который запускает большое количество генов, отвечающих за иммунный ответ. При иммунном ответе имеет значение концентрация гемолизина. Дозозависимый эффект гемолизина был установлен на клеточной линии эпителия кишечника человека Т-84. При низких концентрациях гемолизин индуцирует воспалительный ответ, происходят повышение проницаемости эпителия и индукция цитокина IL-8 и TNF- α . Клетки эпителия являются первой линией защиты на пути патогена и их роль заключается в мобилизации иммунных клеток в сайт инфицирования. Высокие дозы гемолизина приводят к поражению клеток и их гибели. Также установили, что воспалительный ответ полностью снимается обработкой протеазой PrtV, то есть гемолизин является субстратом для протеазы. Предполагается, что в зависимости от окружающих условий PrtV модулирует активность гемолизина [20, 22]. Такое разнообразие ответов, индуцируемых гемолизином, указывает на значительную, но не до конца установленную его роль в вирулентности *V. cholerae*, особенно у штаммов, лишенных холерного токсина СТ.

Важная роль в патогенности холерных вибрионов принадлежит факторам адгезии. Токсин-корегулируемые пили адгезии (ТСР) признаны ведущим фактором колонизации кишечника человека [11, 28]. Маннозо-чувствительные пили адгезии (MSHA) рассматривают как фактор, который не играет существенной роли при развитии заболевания у человека, но обеспечивает большое преимущество для выживания *V. cholerae* в водной среде, благодаря его участию в формировании биопленок на биотических и абиотических поверхностях (в том числе на хитиновых покровах беспозвоночных) [5, 24, 32]. Для более углубленного изучения роли MSHA в адаптации холерного вибриона к естественным условиям водоемов и противостоянии его хищным обитателям (простейшим, нематодам) List et al. сконструировали мутант по гену *msh A*, кодирующий главную субъединицу этого фактора. Методом флуоресцентной микроскопии оценили степень прикрепления холерного вибриона к хитину глотки *Caenorhabditis elegans*. Хитин является компонентом глотки нематод в определенных областях стенки. Интенсивность флуоресценции была выше у нематод, которых культивировали на полноценном штамме по сравнению с *msh* мутантом; уровень колонизации также был выше у полноценного штамма. Ген *msh* не оказывал влияния на продолжительность жизни червей, но способствовал замедлению роста и задержке развития. Таким образом, пили MSHA имеют решающее значение для прикрепления *V. cholerae* к глотке червя и инициации колонизации. Возможно, это свойство является преимуществом при контакте с хищными нематодами и способствует сохранению холерного вибриона в водной среде [16]. Недавно на модели *C. elegans* был идентифицирован новый фактор вирулентности холерного вибриона — цитотоксин МАкА [9]. Белок МАкА кодируется полицистронным опероном *makDCBA*, с помощью рентгеноструктурного анализа была построена структурная модель, которая обнаружила высокое сходство с суперсемейством бактериальных токсинов с неизвестными биологическими функциями. Транслокация токсина происходит с помощью жгутика *V. cholerae*. Энергия перемещения через мембрану обеспечивается движущей силой протонов. Цитотоксин МАкА вызывал гибель нематод рыбок *Danio rerio*. Секреция белка через канал жгутика представляет собой неизвестную ранее систему секреции белков вирулентности у холерного вибриона. Цитотоксин может способствовать распространению *Vibrio cholerae* в окружающей среде, обеспечивая выживание, его также можно рассматривать в качестве потенциального фактора вирулентности, способствующего инфицированию человека [9].

В своей естественной среде обитания в различных водоемах холерный вибрион сталкивается с широким спектром неблагоприятных факторов, которые представляют угрозу его выживанию: как биотических — хищные простейшие, мелкие ракообразные и др., так и абиотических — рН среды, изменение температуры, недостаток питания, осмотический шок [10]. В холодные месяцы в странах с жарким климатом резервуаром для *Vibrio cholerae* могут служить донные отложения; в этих условиях вибрион вынужден противостоять нематодам, которые составляют большинство представителей мейофауны (бактерицидные нематоды — 50% от общего количества нематод) [31]. Селективное давление приводит к появлению защитных механизмов, которые, с одной стороны, позволяют вибриону персистировать в водном окружении, а с другой — при попадании в организм человека могут функционировать как факторы вирулентности. Примером такой адаптации может служить протеаза PrtV. В водной среде PrtV защищает *V. cholerae* от хищных обитателей, таких как *C. roenbergensis* и *T. puriformis*, и вместе с тем оказывает цитотоксическое действие на культуры клеток кишечника человека, разрушает компоненты крови человека [17, 20, 29]. Объяснить возникновение таких факторов с двойной функцией теперь пытаются с помощью гипотезы coincidental evolution (гипотеза эволюции совпадений). Факторы, имеющие значение для сохранения холерного вибриона в естественных условиях, потенциально могут участвовать в патогенезе человека [8, 24]. Явление бифункциональности дает возможность успешно использовать *C. elegans* в качестве биологической модели для изучения патогенетических свойств холерного вибриона.

Литература

1. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации // Пробл. особо опасных инф. — 2013. — № 4. — С. 60–68.
2. Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы не01/не0139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире // Пробл. особо опасных инф. — 2016. — № 2. — С. 14–23.
3. Aballay A., Ausubel F.M. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions // Curr. Opin. Microbiol. — 2002. — Vol. 5. — No. 1. — P. 97–101.
4. Chen J., Jonson J.A., Push G.D., Morris J.G., Stine O.C. The genome of non-01 *Vibrio cholerae* NRT 36S demonstrates the presence of pathogenic mechanisms that are distinct from 01 *Vibrio cholerae* // Infect. Immun. — 2007. — Vol. 75. — P. 2645–2647.
5. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol. 67. — P. 3220–3225.
6. Cinar H.N., Kothary M., Taylor R.K., Tall B.D., Sprando R., Bilecen K. *Vibrio cholerae* hemolysin is required for lethality, development delay, and intestinal vacuolation in *Caenorhabditis elegans* // PLoS One. — 2010. — Vol. 5. — No. 7. — e11558. doi: 10.1371/journal.pone.0011558.
7. De S., Bubnys A., Alonzo F., Huan J., Lary J.W., Cole J.L., Torres V.J., Olson R. The relationship between glycan binding and direct membrane interactions in *Vibrio cholerae* cytolysin, a channel-forming toxin // J. Biol. Chem. — 2015. — Vol. 290. — No. 47. — P. 28402–28415.
8. Diard M., Hardt W.D. Evolution of bacterial virulence // FEMS Microb. Rev. — 2017. — Vol. 41. — P. 679–697.
9. Dongre M., Singh B., Aung K., Larsson P., Miftakhova R., Persson K., Askarian F., Johannessen M., Hofsten J. von. Flagella-mediated secretion of a novel *Vibrio cholerae* cytotoxin affecting both vertebrate and invertebrate hosts // Commun Biol. — 2018. — Vol. 1. — P. 59. doi: 10.1038/s42003-018-0065-z.
10. Erken M., Lutz C., McDougald D. The rise of pathogens: predation as a factor driving the evolution of human pathogens in the environment // Microb. Ecol. — 2013. — Vol. 65. — No. 4. — P. 860–868.
11. Fareque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1998. — Vol. 62. — P. 1301–1314.
12. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology / *C. elegans* Sequencing Consortium // Science. — 1998. — Vol. 282. — No. 5396. — P. 2012–2018.
13. Khan F., Yain S., Oloketuyi S.F. Bacteria and bacterial products: foe and friends to *Caenorhabditis elegans* // Microbiol. Rev. — 2018. — Vol. 215. — P. 102–113.
14. Khilwani B., Chattopadhyay K. Signaling beyond punching holes: modulation of cellular responses by *Vibrio cholerae* cytolysin // Toxins (Basel). — 2015. — Vol. 7. — No. 8. — P. 3344–3358.
15. Kurz C.L., Ewbank J.J. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions // Trends in Microbiol. — 2000. — Vol. 8. — P. 142–144.
16. List G., Grutch A., Radler C., Cakar F., Zingl F.G., Schild-Prufert K., Schild S. Genes activated by *Vibrio cholerae* upon exposure to *Caenorhabditis elegans* reveal the mannose-sensitive hemagglutinin to be essential for colonization // mSphere. — 2018. — Vol. 3(3). — pii: e00238-18. doi: 10.1128/mSphereDirect.00238-18.
17. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholera* // Front Microbiol. — 2013. — Vol. 4. — P. 375. doi: 10.3389/fmicb.2013.00375.
18. Markaki M., Tavemarakis N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans* // Biotechnol. — 2010. — Vol. 5. — P. 1261–1276.

19. Olson R., Gouaux E. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) pro-toxin and its assembly into a heptameric transmembrane pore // *J. Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 350. — No. 5. — P. 997–1016.
20. Ou G., Rompikuntal P.K., Bitar A., Lindmark B., Vaitkevicius K., Wai S.N., Hammarstrom M-L. *Vibrio cholerae* cytolysin causes an inflammatory response in human intestinal epithelial cells that is modulated by the PrtV protease // *PLoS One.* — 2009. — Vol. 4(11). — e7806. doi: 10.1371/journal.pone.0007806.
21. Rompikuntal P.K., Vdovikova S., Duperthuy M., Jonson T.L., Ahlund M., Lindmark R., Oscarsson J. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae* // *PLoS One.* — 2015. — Vol. 10(7). — e0134098. doi:10.1371/journal.pone.0134098.
22. Sahu S.N., Levis J., Patel I., Bozdag S., Lee J.H., LeClerk J.E., Cinar H.N. Genomic analysis of immune response against *Vibrio cholerae* hemolysin in *Caenorhabditis elegans* // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7(5). — e38200. doi: 10.1371/journal.pone.0038200.
23. Saka H.A., Bidinost C., Sola C., Echenquef J.R., Bocco J.L. *Vibrio cholerae* cytolysin is essential for high enterotoxigenicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-01, non-0139 strains // *Microb. Patholog.* — 2008. — Vol. 44. — No. 2. — P. 118–128.
24. Sakib S.N., Reddy G., Almargo-Moreno S. Environmental role of pathogenic traits in *Vibrio cholerae* // *J. Bacteriol.* — 2018. — Vol. 200(15). — e00795-17. doi: 10.1128/JB.00795-17.
25. Sterken M.G., Snoek L.B., Kammenga J.E. The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans* // *Trends Genet.* — 2015. — Vol. 31. — No. 5. — P. 224–231.
26. Stiernagle T. Maintenance of *Caenorhabditis elegans* // *WormBook.* — 2006. — Vol. 11. — P. 1–11.
27. Tan M.W., Mahajan S., Ausubel F.M. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — Vol. 96(2). — P. 715–720.
28. Tripathi S.A., Taylor R.K. Membrane association and multimerization of Tcp T, the cognate ATPase ortholog of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus biogenesis apparatus // *Journ. of Bacteriol.* — 2007. — Vol. 189. — No. 12. — P. 4401–4409.
29. Vaitkevicius K., Lindmark B., Ou G., Song T., Toma C., Iwanga M., Zhu J., Anderson A., Hammarstrom M-L., Tuck S., Wai S.N. A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — Vol. 103. — No. 24. — P. 9280–9285.
30. Vaitkevicius K., Rompikunta P.K., Lindmark B., Vaitkevicius R., Song T., Wai S.N. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. Purification and properties // *FEBS J.* — 2008. — Vol. 275. — No. 12. — P. 3167–3177.
31. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by filamentous phage encoding cholerae toxin // *Science.* — 1996. — Vol. 272(5270). — P. 1910–1914.
32. Watnick P.I., Fullner K.J., Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor // *Journ. of Bacteriol.* — 1999. — Vol. 181. — P. 3606–3609.
33. Zhang R., Hou A. Host-microbe interactions in *Caenorhabditis elegans* // *ISRN Microbiol.* — 2013. — Vol. 2013. — P. 356451. doi: 10.1155/2013/356451.
34. Zitzer A., Wassenar T.M., Walev I., Bhakdi S. Potent membrane-permeability and cytotoxic action of *Vibrio cholerae* cytolysin on human intestinal cells // *Infect. Immun.* — 1997. — Vol. 65. — No. 4. — P. 1293–1298.

NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS* AS A BIOLOGICAL MODEL FOR STUDYING THE PATHOGENETIC PROPERTIES OF CHOLERA VIBRIO

G.V. DEMIDOVA

Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

The review analyzes the capabilities of the nematode *Caenorhabditis elegans* as a biological model for studying the pathogenetic properties of cholera vibrio. The *C. elegans* genome is sequenced and contains more than 20,000 genes, 60–80% of which are homologous to human ones. Using modern genetic and bioinformation technologies, proteins and molecular pathways included in pathogenetic processes can be identified relatively quickly. To study the relationship between *V. cholerae* and invertebrate predators in the aquatic environment, *C. elegans* nematode is an indispensable natural biological model. For example, the MAkA cytotoxin can promote the spread of *Vibrio cholerae* in the environment, ensuring survival; it can also be considered as a potential virulence factor contributing to human infection.

Keywords: nematode, *Caenorhabditis elegans*, biological model, cholera pathogenesis.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ПОДХОДЫ В РАЗРАБОТКЕ СИСТЕМ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ ОБИТАЕМЫХ КОСМИЧЕСКИХ АППАРАТОВ. ЧАСТЬ 1

Д.В. СУХИНОВ^{1,2*}, П.М. ГОТОВЦЕВ¹, Я.Э. СЕРГЕЕВА¹, К.В. ГОРИН¹, Р.Г. ВАСИЛОВ¹

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,*

² *Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Москва*

В данной статье проводится обзор современных публикаций, посвященных исследованиям и разработкам в области систем поддержания жизни для пилотируемых космических аппаратов. Рассматриваются различные подходы от термохимических и электрохимических до частично биологических, в которых метаболизм различных микроорганизмов используется для переработки отходов, полученных на предыдущих физико-химических стадиях. Имеющиеся и разрабатываемые в этой области технологические решения пока что не могут обеспечить безотходной и эффективной рециркуляции воды и кислорода. Однако дальнейшее усовершенствование используемых технологий может привести к более перспективным для систем жизнеобеспечения результатам, которые в будущем могут быть использованы в активно разрабатываемых проектах окололунной космической станции Gateway и пилотируемых полетов Artemis на Луну, а затем и в проектах пилотируемых полетов на Марс.

Ключевые слова: системы жизнеобеспечения, пилотируемая космонавтика, исследование Луны и Марса.

Введение

Сегодня освоение космического пространства перестает быть прерогативой государственных агентств. Появление и выход на рынок частных компаний ведут к увеличению числа запусков космических ракет, а успех частных компаний позволяет им занять определенные массовые сегменты соответствующего рынка, что, в свою очередь, дает возможность государственным агентствам сконцентрироваться на более крупных проектах.

Среди таких проектов особое место занимает пилотируемая космонавтика, для которой обсуждаются вопросы длительного пребывания человека в космосе при дальних экспедициях на Марс [9, 10]. При этом важной задачей для будущих пилотируемых экспедиций является жизнеобеспечение экипажа и поддержание его здоровья и работоспособности [34].

Несмотря на то, что существующие технологии позволяют создать пилотируемый корабль, способный достичь Марса, затраты на поставку расходных материалов, таких как кислород, вода, пища и т.д. представ-

ляются слишком большими и не позволяют совершить данный перелет [34]. Однако возможным решением данной проблемы является создание системы жизнеобеспечения экипажа, повторно использующей одни и те же материалы. Система поддержания жизнедеятельности должна обеспечивать максимально возможное повторное использование ресурсов, чтобы минимизировать вес, который требуется экспедиции [38]. Следовательно, такая система должна быть в значительной степени замкнута и надежна [14, 35].

Эксперименты по созданию замкнутых систем жизнеобеспечения и пребыванию в них человека осуществлялись еще с 1960-х годов, когда в России проводились исследования с использованием систем Bios-1 и Bios-2 [17], на основе которых в начале 1970-х была спроектирована система Bios-3 [18]. В это же время, с начала 1960-х годов, в США начали проводиться исследования возможности регенерации атмосферы [13]. В 1980-е годы NASA выполнила эксперименты с Controlled Ecological Life Support Systems (CELSS) [46], в 1990-е был реализован масштабный эксперимент с замкнутой экосистемой в рамках проекта Biosphere-2 в Аризоне [35]. Кроме того, в настоящее время действует целый ряд экспериментальных установок в разных странах, к которым относятся: Japanese Closed Environmental Facility (CEEF) [37], the European Micro-Ecological Life Support Systems (MELiSSA) [45], the Canadian Controlled

© 2019 г. Сухинов Д.В., Готовцев П.М., Сергеева Я.Э., Горин К.В., Василов Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Сухинов Даниил Владиславович

магистрант НИЦ «Курчатовский институт»

E-mail: suhinov.dv@phystech.edu

Environmental Systems Research Facility (CESRF) [5], the Chinese Controlled Environment Life Support System and laboratory biosphere [48] и некоторые другие. Эксперименты с указанными установками длились, как правило, менее года. Целью данных экспериментов было, с одной стороны, создать замкнутые системы жизнеобеспечения, по возможности приближенные к естественным, с другой — изучить возможность пребывания человека в таких системах. При этом указанные выше установки предназначаются, в первую очередь, для создания замкнутых систем и поиска перспективных технологий, а не для прямого переноса на существующие или разрабатыва-

емые космические корабли [35]. Для следующего шага — переноса таких систем жизнеобеспечения в реальные космические корабли необходимы эксперименты уже более высокого уровня, с постепенным внедрением соответствующих технологий [3].

Замкнутые системы жизнеобеспечения должны в идеальном случае гарантировать, как минимум, полную рециркуляцию кислорода и воды, как максимум — повторное использование минеральных компонентов, а в идеале и реализовывать цикл углерода [35, 38]. Физиологические факторы, связанные с ежедневной жизнедеятельностью человека, показаны на рисунке 1.

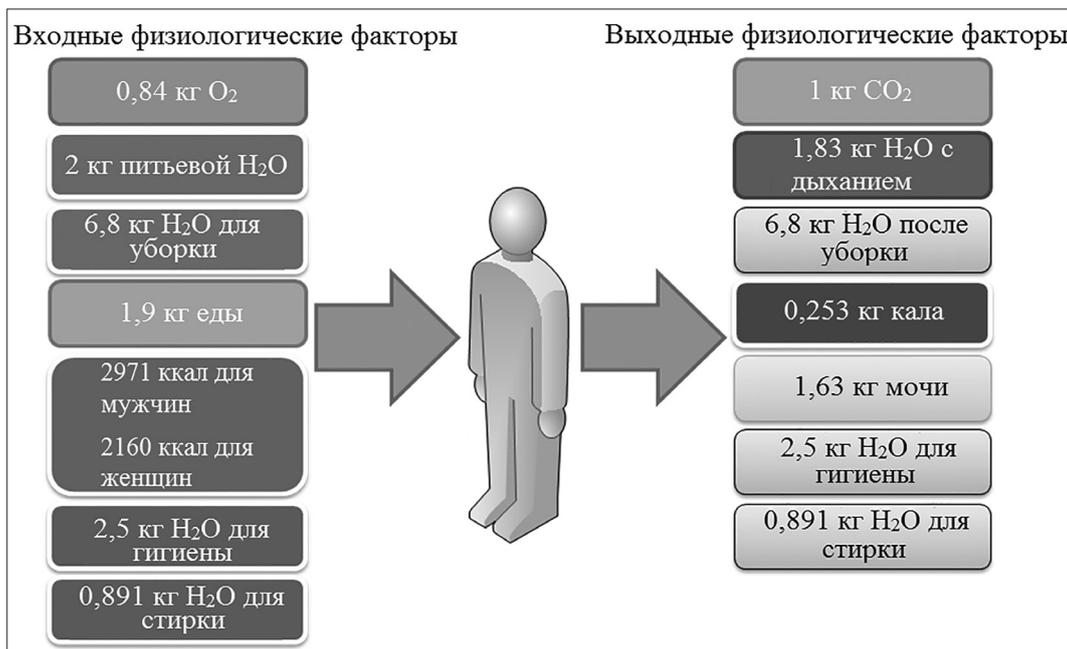


Рис. 1. Ежедневные входные и выходные физиологические факторы для человека [38]

Создание подобной системы жизнеобеспечения является сложной научной и инженерной задачей и требует анализа опубликованных данных по результатам проведенных исследований. Далее проводится анализ существующих и перспективных подходов и технологий для решения задач рециркуляции воды и кислорода.

Физико-химические процессы регенерации воды и кислорода

В настоящее время большое внимание уделяется совершенствованию электрохимических и термохимических методов, используемых на Международной космической станции (МКС) [4, 50]. Для непрерывного проведения миссий на МКС используются системы жизнеобеспечения, которые, по последним оценкам, достигают степени рециркуляции кислорода до 50% [23], а воды — до 70% [43]. Весьма интересными в данном

контексте являются реакции углекислого газа с водородом, а именно: реакции Сабатье [50] и Боша [2, 32].

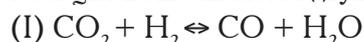
Реакция Сабатье:



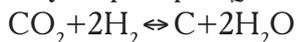
Реакция Сабатье является каталитической.

Значительный интерес на сегодня представляют катализаторы на основе оксида кобальта Co_3O_4 или более эффективные кобальт-рутениевые катализаторы на основе $(\text{Co}_{0.95}\text{Ru}_{0.95})_3\text{O}_4$ [49]. Кроме того, показаны успешные результаты с использованием $\text{Pb}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ и $\text{Rh}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ [24]. Температура протекания реакции 250–400 °С с использованием современных катализаторов [24, 49].

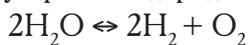
Реакция Боша является двухстадийной [1]:



Суммарная реакция Боша:



Использование обеих реакций требует комбинирования с процессом электролиза воды для получения молекулярного водорода:



Реакция Боша протекает в присутствии железного катализатора при температурах 530–730 °С [32].

Комбинация реакции Сабатье с электролизом ведет к образованию метана и также появляется избыток кислорода, потому что на 1 молекулу CO_2 требуется затратить 4 молекулы H_2 , для получения которого необходимо затратить 4 молекулы воды, в то время как в результате реакции образуются всего лишь 2 молекулы воды. Оставшейся

свободной молекулы кислорода недостаточно для полного сжигания молекулы метана по реакции:



Таким образом, при использовании процесса Сабатье возникает необходимость в утилизации образующегося метана и избытка кислорода. Интересным решением данной проблемы является использование систем для пиролиза метана, в том числе двигателей [25]. Пиролиз метана позволяет вернуть часть водорода и использовать его для получения электричества в топливных элементах [7]. Принципиальная схема такой системы регенерации кислорода представлена на рисунке 2. Как видно из этого рисунка, такая схема позволяет создать цикл кислорода и при наличии системы регенерации воды — цикл воды.

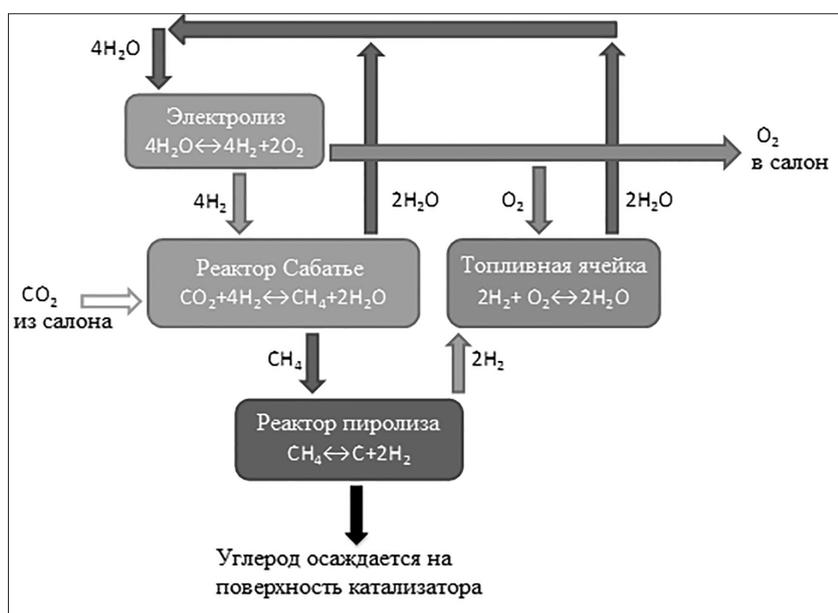


Рис. 2. Схема регенерации кислорода с использованием реакции Сабатье

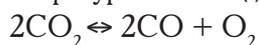
Не менее интересным способом утилизации метана является его каталитическое разложение до углеродного волокна и водорода с использованием Ni-Co-Al катализатора [15]. Данный метод также является высокотемпературным и может быть актуален в случае необходимости получения углеродных материалов для перспективных баз на Луне или Марсе.

Реакция Боша требует более высоких температур, чем реакция Сабатье. Также серьезной проблемой представляется потеря эффективности катализатора в процессе работы из-за того, что его поверхность покрывается образующимся твердым углеродом [2, 25]. Однако данная реакция требует только две молекулы H_2 на одну молекулу CO_2 и производит при этом две молекулы воды, что позволяет замкнуть цикл по воде и кислороду без дополнительных процессов, как в случае

схемы на рисунке 2. В связи с этим работы по оптимизации конструкции реактора, подбору катализаторов и решению проблем с их загрязнением углеродом продолжают [1, 2].

Кроме двух рассмотренных выше реакций, для регенерации кислорода в настоящее время могут рассматриваться еще несколько процессов, среди которых следует отметить электролиз углекислого газа [12] и реакция конверсии водяного газа [47].

Электролиз углекислого газа протекает при высоких температурах от 750 до 1000 °С по реакции:



В качестве катализаторов используются платина и никель [12]. Также рассматривается возможность использования твердооксидного электролиза [20]. Утилизировать CO можно по реакции диспропорционирования

Будуарда (которая является одной из стадий реакции Боша):



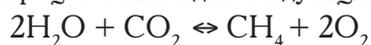
Из представленной реакции можно сделать вывод, что схема с электролизом углекислого газа обладает теми же основными недостатками, что и реакция Боша, а именно: требует высоких температур и потери эффективности катализатора из-за осаждения на электроде углерода. Однако электролиз углекислого газа по предложенной схеме не требует водорода, в отличие от реакции Боша, что позволяет в общем разделить систему регенерации кислорода и систему регенерации воды. Если в перспективе удастся создать электролизер, сопоставимый по массе с системами для реакций Боша и Сабатье, то можно ожидать выигрыша в массе за счет отсутствия цикла воды в системе регенерации кислорода.

Реакция сдвига вода/газ (water-gas shift reaction, WGSR) достаточно хорошо изучена [19, 47] и представляет собой следующий процесс:



Эта реакция протекает при температурах от 170 до 450 °С [41, 47]. Сейчас изучены многие катализаторы для повышения эффективности протекания WGSR [31, 40]. Существенным недостатком является то, что использование WGSR позволяет регенерировать только половину кислорода. Однако далее может применяться реакция диспропорционирования Будуарда, чтобы обеспечить более полную регенерацию кислорода.

Процесс, аналогичный реакции Сабатье, совмещенной с электролизом, можно проводить и с использованием микроорганизмов. В работе [36] разработана система, в которой за счет электролиза получается водород, совместно с углекислым газом используемый для получения метана. Авторы подобрали недорогие катализаторы для электролиза и выбрали архею *Methanosarcina barkeri* для фиксации углекислого газа. Оба процесса осуществляются в одном устройстве. Суммарная реакция всего процесса выглядит следующим образом:



В целом эта реакция дает тот же элементный баланс, что и реакция Сабатье, совмещенная с электролизом. Тем не менее можно ожидать, что за счет использования микроорганизмов такое решение может быть менее энергозатратным при дальнейшей проработке.

У всех описанных выше процессов есть существенный недостаток, а именно: углерод в итоге выбрасывается в космос или является отходом, следовательно, в системе жизнеобеспечения отсутствует цикл углерода. Однако в настоящее время существуют химические и биологиче-

ские процессы по использованию метана и монооксида углерода в синтетических процессах. В следующем разделе рассмотрим данные процессы детально и проанализируем, насколько они применимы к замкнутым системам жизнеобеспечения.

Биосинтетический и химико-синтетический подходы к утилизации метана и монооксида углерода

Метан может использоваться как сырье для биотехнологии [16] и для химической промышленности [6].

В настоящее время метанотрофные микроорганизмы уже используются для биосинтеза белков, витаминов, биополимеров, антибиотиков и жидкого моторного топлива из метана [16, 26]. При этом обнаружены микроорганизмы и их сообщества, которые способны расти на метане в анаэробных условиях, используя сульфаты или нитраты [8, 39]. Данные микроорганизмы культивируются при температурах от 25 до 45 °С и нейтральных величинах рН. Кроме того, при их использовании в схеме с регенерацией кислорода процессом Сабатье создание анаэробных условий не потребует каких-либо сложных систем разделения газов. Тем не менее ныне требуется генно-инженерная модификация данных штаммов микроорганизмов с целью придания им способности синтезировать продукты, которые необходимы во время экспедиции. К таким продуктам могут относиться пищевые белки и/или биомасса, витамины [30]. Эти метанотрофные микроорганизмы обладают потенциалом к созданию таких генно-инженерных штаммов, но подобные работы находятся только на самых начальных стадиях [16]. Кроме того, следует отметить, что на сегодняшний день не проводился анализ материального баланса биосинтеза в таком цикле утилизации метана, чтобы дать оценку массы вовлеченных в процесс микроорганизмов, от которой можно было бы оценить объем среды для их культивирования, необходимый запас солей и т.д.

Сейчас метан также используется в качестве сырья для химического синтеза. Наиболее известный процесс без участия кислорода — это синтез ацетилен, который проходит при температурах свыше 1000 °С по следующей реакции [6]:



Полученный по этой реакции ацетилен может использоваться в качестве топлива совместно с аммиаком в перспективных двигателях [29, 42]. Физико-химические свойства таких смесей теперь активно изучаются [28], и они находят применение в различных областях, например, для вакуумного осаждения углерода [21]. Однако указанная схема дефицитна по воде, так как по сравнению со схемой с пиролизом метана (см. рис. 2)

в цикл возвращаются только $\frac{3}{4}$ водорода, чего недостаточно для полной рециркуляции воды. Кроме того, получение аммиака также ведет к дисбалансу по водороду, кислороду и азоту. Следовательно, такое решение может быть обосновано при возможности использования «внешних» ресурсов, например, ресурсов других планет или спутников.

При электролизе углекислого газа или при проведении WGSR в качестве продукта образуется CO. Это ведет к неполной рециркуляции кислорода и, следовательно, такие схемы ведут к расходу воды. Однако в настоящее время CO используется в качестве сырья для биотехнологических производств [22]. Уже сегодня с применением смеси монооксида углерода и водорода, получаемых газификацией твердого топлива, производится целый ряд продуктов: от биоэтанола до изопропанола, бутанола и уксусной кислоты [27]. В работе [44] показана возможность синтеза полигидроксibuтирата на смеси газов, содержащих до 30% CO. Использование методов генетической инженерии может позволить создать штаммы микроорганизмов, продуцирующие веще-

ства, которые могут потребляться во время длительной экспедиции, например, в качестве добавок в пищу (белки, аминокислоты и т.д.) [30]. Принципиальная схема такой системы регенерации кислорода представлена на рисунке 3. В настоящее время такое решение не проработано в достаточной степени в научных лабораториях, чтобы дать детальную оценку характеристик. Однако можно отметить, что ожидаемым преимуществом такой схемы может представляться снижение энергозатрат, так как и WGSR и процессы биосинтеза являются менее энергозатратными, чем процессы на основе реакций Сабатье и Боша. С другой стороны, такая схема регенерации становится многокомпонентной с многочисленными взаимосвязями, поэтому выход из строя одного из компонентов может привести к выходу из строя сразу нескольких систем. Например, отказ в работе системы переработки отходов может привести к тому, что образуется недостаток воды для работы электролизера и далее к недостатку кислорода. Такие комплексные системы, возможно, смогут в будущем найти применение при размещении поселений на других планетах или для крупных космических станций.

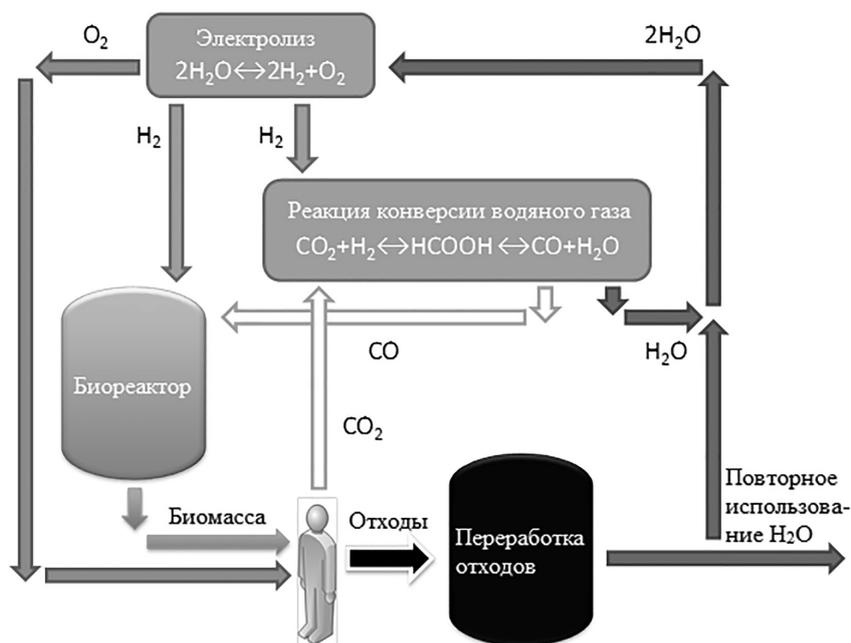


Рис. 3. Принципиальная схема регенерации кислорода с использованием реакции конверсии водяного газа

Рассмотренные выше физико-химические методы регенерации воды и кислорода с максимальным уменьшением количества получаемых отходов являются весьма энергозатратными и/или требуют высоких температур. При этом такие процессы на сегодняшний момент не могут решить еще одну важную проблему — обеспечение экипажа пищей [11, 33]. Для решения указанной задачи довольно естественно рассмотреть введение биологи-

ческих модулей, включающих в себя многоклеточные растения и/или различные микроорганизмы.

Заключение

Как видно из представленного обзора, исследования, направленные на создание систем жизнеобеспечения для обитаемых космических аппаратов, на данный момент

ведутся весьма активно. Рассматриваются различные подходы от термохимических и электрохимических до частично биологических, в которых метаболизм различных микроорганизмов используется для переработки отходов, полученных на предыдущих физико-химических стадиях. Тем не менее имеющиеся и разрабатываемые в этой области технологические решения пока что не могут обеспечить безотходной и эффективной рециркуляции воды и кислорода. Возможно, усовершенствование используемых технологий сможет привести к более перспективным для систем жизнеобеспечения результатам, которые в дальнейшем могут быть использованы в проектах окололунной космической станции Gateway и пилотируемых полетов Artemis на Луну, а затем и в проектах пилотируемых полетов на Марс. Одними из наиболее перспективных путей дальнейшего усовершенствования эффективности переработки отходов и одновременно частичного или полного решения проблем с питанием астронавтов являются так называемые биологические системы жизнеобеспечения. Такие системы полностью основаны на метаболизме различных растений и микроорганизмов, наибольший интерес из которых вызывают нетоксичные цианобактерии. Обзор подобных систем и используемых в них технологий будет проведен в следующей статье.

Литература

1. *Abney M.B. et al.* Series-Bosch Technology for Oxygen Recovery During Lunar or Martian Surface Missions / Int. Conf. Environ. Syst. 44th; 13–17 Jul. 2014. – Tuscon, AZ; United States, 2014.
2. *Abney M. et al.* Ongoing Development of a Series Bosch Reactor System / Int. Conf. Environ. Syst. 43rd; 14–18 Jul. 2013. – Vail, CO; United States, 2013.
3. *Anderson M.S., Ewert M.K., Keener J.F.* Life Support Baseline Values and Assumptions Document. Technical Report. – NASA Johnson Space Center; Houston, TX, United States, 2018. – 233 p.
4. *Bagdigian R.M.* Status of the International Space Station Regenerative ECLSS Water Recovery and Oxygen Generation Systems, 2005.
5. *Bamsey M. et al.* Canadian advanced life support capacities and future directions // Adv. Sp. Res. COSPAR. – 2009. – Vol. 44. – No. 2. – P. 151–161.
6. *Behringer H.* Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. – Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
7. *Belz S. et al.* Physicochemical and biological technologies for future exploration missions // Acta Astronaut. Elsevier. – 2014. – Vol. 101. – No. 1. – P. 170–179.
8. *Boetius A. et al.* A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane // Nature. – 2000. – Vol. 407(6804). – P. 623–626.
9. *Cucinotta F.A. et al.* How safe is safe enough? Radiation risk for a human mission to Mars // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – No. 10. e74988.
10. *Drake B.G., Hoffman S.J., Beaty D.W.* Human Exploration of Mars Design Reference Architecture 5.0. – CreateSpace Independent Publishing Platform, 2009. – P. 100.
11. *Drysdale A.E., Ewert M.K., Hanford A.J.* Life support approaches for Mars missions // Adv. Space Res. – 2003. – Vol. 31. – No. 1. – P. 51–61.
12. *Ebbesen S.D., Mogensen M.* Electrolysis of carbon dioxide in Solid Oxide Electrolysis Cells // J. Power Sources. – 2009. – Vol. 193. – No. 1. – P. 349–358.
13. *Eley J.H.J., Myers J.* Study of a photosynthetic gas exchanger, a quantitative repetition of the priestley experiment // Texas J. Sci. – 1964. – Vol. 16. – P. 296–333.
14. *Escobar C., Nability J., Klaus D.* Defining ECLSS Robustness for Deep Space Exploration. 47th International Conference on Environmental Systems, 2017.
15. *Fakeeha A.H. et al.* Production of hydrogen and carbon nanofibers from methane over Ni–Co–Al catalysts // Int. J. Hydrogen Energy. Elsevier Ltd. – 2015. – Vol. 40. – No. 4. – P. 1774–1781.
16. *Fei Q. et al.* Bioconversion of natural gas to liquid fuel: Opportunities and challenges // Biotechnol. Adv. The Authors. – 2014. – Vol. 32. – No. 3. – P. 596–614.
17. *Gitelson I.I. et al.* Life support system with autonomous control employing plant photosynthesis // Acta Astronaut. – 1976. – Vol. 3. – No. 9–10. – P. 633–650.
18. *Gitelson I.I. et al.* Long-term experiments on man's stay in biological life-support system // Adv. Sp. Res. – 1989. – Vol. 9. – No. 8. – P. 65–71.
19. *Gradisher L., Dutcher B., Fan M.* Catalytic hydrogen production from fossil fuels via the water gas shift reaction // Appl. Energy. – 2015. – Vol. 139. – P. 335–349.
20. *Hoffman J.A., Rapp D., Hecht M.* The Mars Oxygen ISRU Experiment (MOXIE) on the Mars 2020 Rover, 2015.
21. *Hsueh H.-C., Wang Y.-K., Lee S.* The effect of ammonia/acetylene ratio on characteristics of amorphous carbon films prepared by plasma enhanced chemical vapor deposition // Surf. Coatings Technol. – 2013. – Vol. 231. – P. 353–356.
22. *Inloes D.S. et al.* Hollow-fiber membrane bioreactors using immobilized *E. coli* for protein synthesis // Biotechnol. Bioeng. – 1983. – Vol. 25. – No. 11. – P. 2653–2681.
23. *Junaedi C. et al.* Compact and lightweight Sabatier reactor for carbon dioxide reduction / In 41st International Conference on Environmental Systems. Reston, Virginia: American Institute of Aeronautics and Astronautics, 2011.

24. Karelavic A., Ruiz P. Improving the hydrogenation function of Pd/ γ -Al₂O₃ catalyst by Rh/ γ -Al₂O₃ addition in CO₂ methanation at low temperature // ACS Catal. – 2013. – Vol. 3. – P. 12. doi: 10.1021/cs400576w.
25. Kenn F. New concepts for the avoidance or utilisation of methane in life support systems // Adv. Sp. Res. – 2011. – Vol. 48. – No. 3. – P. 457–464.
26. Khmelena V.N. et al. Biosynthesis of secondary metabolites in methanotrophs: Biochemical and genetic aspects (Review) // Appl. Biochem. Microbiol. – 2015. – Vol. 51. – No. 2. – P. 150–158.
27. Kundiyana D.K. et al. Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by «Clostridium ragsdalei» // Bioresour. Technol. – 2011. – Vol. 102. – No. 10. – P. 5794–5799.
28. Liu X., Xu Y. A new sub-band of the acetylene-ammonia complex in the vicinity of ν_4 mode of ammonia // J. Mol. Spectrosc. – 2012. – Vol. 275. – P. 28–30.
29. McGinnis R.L., McCutcheon J.R., Elimelech M. A novel ammonia-carbon dioxide osmotic heat engine for power generation // J. Memb. Sci. Elsevier. – 2007. – Vol. 305. – No. 1–2. – P. 13–19.
30. Menezes A.A. et al. Towards synthetic biological approaches to resource utilization on space missions. Towards synthetic biological approaches to resource utilization on space missions // J.R. Soc. Interface. – 2015. – Vol. 12(102). – Article ID: 20140715. doi: 10.1098/rsif.2014.0715.
31. Meshkani F., Rezaei M. Hydrogen production by high temperature water gas shift reaction over highly active and stable chromium free Fe–Al–Ni catalysts // Int. J. Hydrogen Energy. – 2015. – Vol. 40. – No. 34. – P. 10867–10875.
32. Messerschmid E., Bertrand R. Space Stations: Systems and Utilization. – Berlin: Springer Verlag, 1999. – 566 p.
33. Montague M. et al. The role of synthetic biology for in situ resource utilization (ISRU) // Astrobiology. – 2012. – Vol. 12. – No. 12. – P. 1135–1142.
34. NASA Technology Roadmaps – TA 6: Human Health, Life Support, and Habitation Systems, 2015.
35. Nelson M., Dempster W.F., Allen J.P. Key ecological challenges for closed systems facilities // Adv. Sp. Res. COSPAR. – 2013. – Vol. 52. – No. 1. – P. 86–96.
36. Nichols E.M. et al. Hybrid bioinorganic approach to solar-to-chemical conversion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – Vol. 112(37). – P. 11461–11466.
37. Nitta K., Otsubo K., Ashida A. Integration test project of CEEF – A test bed for closed ecological life support systems // Adv. Sp. Res. – 2000. – Vol. 26. – No. 2. – P. 335–338.
38. Quantius D. et al. Initial design of laboratories for sustainable habitation // Acta Astronaut. – 2014. – Vol. 94. – No. 2. – P. 541–562.
39. Raghoebarsing A.A. et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification // Nature. – 2006. – Vol. 440(7086). – P. 918–921.
40. Salehirad A., Khoshgouei M.B. A novel synthesis approach to improve structural and catalytic properties of Mn-Ni-Si mixed oxide powders for water gas shift reaction // J. Ind. Eng. Chem. – 2015. – Vol. 29. – P. 314–320.
41. Soria M.A. et al. Enhancing the low temperature water–gas shift reaction through a hybrid sorption-enhanced membrane reactor for high-purity hydrogen production // Fuel. – 2015. – Vol. 159. – P. 854–863.
42. Swami Nathan S., Mallikarjuna J.M., Ramesh A. Effects of charge temperature and exhaust gas re-circulation on combustion and emission characteristics of an acetylene fuelled HCCI engine // Fuel. Elsevier. – 2010. – Vol. 89. – No. 2. – P. 515–521.
43. Tobias B., Garr J., Erne M. International space station water balance operations / In 41st International Conference on Environmental Systems. Reston, Virginia: American Institute of Aeronautics and Astronautics, 2011.
44. Volova T., Zhila N., Shishatskaya E. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) by the autotrophic CO-oxidizing bacterium *Seliberia carboxydohydrogena* Z-1062 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Springer Berlin Heidelberg. – 2015. – Vol. 42. – No. 10. – P. 1377–1387.
45. Walker J., Granjou C. MELiSSA the minimal biosphere: Human life, waste and refuge in deep space // Futures. – 2017. – Vol. 92. – P. 59–69.
46. Wheeler R.M. et al. NASA's biomass production chamber: A testbed for bioregenerative life support studies // Adv. Sp. Res. – 1996. – Vol. 18. – No. 4–5. – P. 215–224.
47. Yasaka Y. et al. Kinetic and equilibrium study on formic acid decomposition in relation to the water-gas-shift reaction // J. Phys. Chem. A. – 2006. – Vol. 110. – No. 38. – P. 11082–11090.
48. Zhang L. et al. Water management in a controlled ecological life support system during a 4-person-180-day integrated experiment: Configuration and performance // Sci. Total Environ. Elsevier B.V. – 2019. – Vol. 651. – P. 2080–2086.
49. Zhu Y. et al. Catalytic conversion of carbon dioxide to methane on ruthenium-cobalt bimetallic nanocatalysts and correlation between surface chemistry of catalysts under reaction conditions and catalytic performances // ACS Catal. – 2012. – Vol. 2. – No. 11. – P. 2403–2408.
50. Zubrin R.M., Muscatello A.C., Berggren M. Integrated Mars in situ propellant production system // J. Aerosp. Eng. American Society of Civil Engineers. – 2013. – Vol. 26. – No. 1. – P. 43–56.

MODERN TECHNOLOGIES AND APPROACHES IN THE LIFE SUPPORT SYSTEMS DEVELOPMENT FOR INHABITED SPACECRAFT. PART 1

D.V. SUKHINOV^{1,2}, P.M. GOTOVTSEV¹, Ya.E. SERGEEVA¹, K.V. GORIN¹, R.G. VASILOV¹

¹ *National Research Centre «Kurchatov Institute»,*

² *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow*

This article reviews current publications on research and development in the field of life support systems for manned spacecraft. Various approaches are considered, from thermochemical and electrochemical to partly biological, in which the metabolism of various microorganisms is used to process waste obtained in previous physicochemical stages. Available and developing technological solutions in this area cannot ensure waste free and efficient recirculation of water and oxygen yet. However, further improvement of the technologies may lead to more promising results for life support systems, which can later be used in actively developing projects like Lunar Orbital Platform-Gateway and Artemis manned flights to the Moon, and then in manned flight projects to Mars.

Keywords: life support systems, manned space exploration, Moon and Mars exploration.

**Памяти академика РАН
К.Г. Скрыбина (1948–2019)**



5 ноября 2019 года скончался Константин Георгиевич Скрыбин, академик РАН и РАСХН, видный российский генетик и биотехнолог, член редакционного совета журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова».

Константин Георгиевич принадлежит к известной династии академиков Скрыбиных — дед был выдающимся гельминтологом, отец — авторитетным микробиологом и биохимиком, создателем Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН в Пущино, ныне носящего его имя. По биологической и академической стезе пошел и внук основателя династии. В 1980 году он окончил биофак МГУ им. М.В. Ломоносова, после чего там же обучался в аспирантуре. Дальше он в течение 15 лет работал в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта.

С 1989 г. по 1991 г. К.Г. Скрыбин был директором Инженерного центра «Биоинженерия» при МНТК «Биоген». С 1991 по 2015 гг. руководил Центром «Биоинженерия» РАН. В последние годы был директором-координатором по биомедицинским технологиям НИЦ «Курчатовский институт», заведующим кафедрой и профессором кафедры генетики биологического факультета МГУ.

Научный вклад К.Г. Скрыбина значителен и разнообразен. Это касается как личных достижений, так и участия в коллективном научном творчестве. Им впервые в мире была установлена полная последовательность ДНК, кодирующих все рибосомные РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (1978–1981). Позднее также была определена полная первичная структура всех генов, детерминирующих синтез витамина B₂ у *Bacillus subtilis*, полная первичная структура генома вируса X картофеля, ДНК-лигазы фага T4, рестриктазы Eco RV, кристаллинов глаза и других генов.

Большая работа под его руководством была проделана в течение многих лет по созданию отечественных сортов картофеля, устойчивых к гербицидам, вирусам, насекомым. В последнее время его научные интересы были сосредоточены на изучении генетического полиморфизма населения Российской Федерации.

Более 10 лет он возглавлял научно-образовательный проект «Кадры для биоинженерии», охватывавший бакалавриат вузов 20 регионов России и вовлекавший молодежь в овладение современными методами в столичных учреждениях.

К.Г. Скрыбин является автором более 600 научных работ. Он удостоен Премии РАН им. А.А. Баева (2019), Премии Ленинского комсомола (1980), Государственной премии СССР (1983).

Он имеет государственные награды: Орден «Дружба народов» (1982), медаль ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени (1999), орден «За заслуги перед Отечеством» IV степени (2008), орден «За заслуги перед Отечеством» III степени (2019).

Константин Георгиевич много работал в составе редакционных коллегий разных российских (в том числе «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова») и международных журналов. Он всегда занимал активную общественную позицию, состоя в многочисленных обществах, советах, комиссиях, ассоциациях и т.д., выступая в СМИ и на публичных мероприятиях.

Редсовет и редколлегия нашего журнала скорбят в связи с этой утратой и выражают соболезнование родным и близким покойного.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 28.12.19
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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