

**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),
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. Василев 4

Оригинальные статьи

Генно-инженерное конструирование продуцента модифицированной формы капсульного антигена чумного микроба с анализом целевого продукта *in silico* и *in vitro*.

А.А. Буданова, И.В. Тучков, М.Н. Киреев, **Н.И. Микиш**, С.А. Бугоркова 5

Разработка защитной среды высушивания для стабилизации эритроцитарного антигенного туляремийного диагностикума.

А.Г. Кошкидько, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, О.Л. Старцева 12

Микробиологический и молекулярно-генетический анализ грибной микрофлоры вермикомпоста, полученного из навоза крупного рогатого скота с использованием компостных червей *Eisenia fetida*.

К.К. Богуспаев, К.А. Мухатаева, Г.К. Каналбек, А.И. Акильбекова,
Д.Г. Фалеев, И.Н. Титов, А.А. Нусупов 17

Биодеградация пищевых азокрасителей лактобациллами, выделенными из различных природных и антропогенных источников.

П.И. Иванова, Т.А. Чердынцева, Е.Ю. Ходжаев, И.А. Савинов,
М.А. Гладченко, Ю.В. Тактарова, И.Б. Котова 23

Совместная доставка гидрофобных и гидрофильных соединений с помощью гибридных полиэлектролитных микрокапсул.

О.Ю. Кочеткова, О.Ю. Антонова 33

Обзоры

Косметика и микробиом. Обзор о влиянии ряда ингредиентов косметических средств на микрофлору кожи.

И.Н. Саметова, Р.Г. Василев 40

Междисциплинарный подход к использованию современных технологий для создания устойчивой системы обращения с твердыми коммунальными отходами.

Т.Н. Гаева, Р.Г. Василев 47

Хроника 61

Правила для авторов 62

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

- Gene-engineering design of the producer of modified form of capsule antigen *Yersinia pestis* with analysis of the target product in silico and in vitro.
A.A. Budanova, I.V. Tuchkov, M.N. Kireev, N.I. Mikshis, S.A. Bugorkova 5
- Development of a protective drying medium to stabilize erythrocyte antigenic tularemia diagnosticum.
A.G. Koshkidko, S.A. Kurcheva, I.V. Zharnikova, O.L. Startseva 12
- Microbiological and molecular genetic analysis of fungal microflora of the vermicompost obtained from cattle manure using earthworms *Eisenia fetida*.
K.K. Boguspaev, K.A. Mukhatayeva, G.K. Kanalbek, A.I. Akilbekova, D.G. Faleev, I.N. Titov, A.A. Nusupov 17
- Biodegradation of food azo dyes by lactobacilli isolated from various natural and anthropogenic sources.
P.I. Ivanova, T.A. Cherdyntseva, E.Yu. Khodjaev, I.A. Savinov, M.A. Gladchenko, Yu.V. Taktarova, I.B. Kotova 23
- Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic compounds using hybrid polyelectrolyte microcapsules.
O.Yu. Kochetkova, O.Yu. Antonova 33

Reviews

- Cosmetics and the microbiome. An overview of the effects of a range of ingredients in cosmetics on the microflora of the skin.
I.N. Sametova, R.G. Vasilov 40
- Interdisciplinary approach to the use of modern technologies for the sustainable municipal solid waste management.
T.N. Gaeva, R.G. Vasilov 47

The chronicle 61

Rules for authors 62

К читателям

Четвертый номер журнала открывается статьей А.А. Будановой с коллегами (из РосНИПЧИ, Саратов), посвященной получению штаммов-продуцентов нативной и мутантной форм капсульного антигена чумного микроба. С помощью генно-инженерных модификаций проведены эксперименты по повышению растворимости F1 чумного микроба с сохранением потенциальных Т-клеточных эпитопов.

В исследовании А.Г. Кошкидько и др. (Ставропольский противочумный институт) описана разработка оптимальных сред высушивания для получения диагностикума эритроцитарного антигенного туляремийного сухого. Осуществлено определение стабильности лиофилизированного препарата при хранении и транспортировании в разных климатических условиях.

Авторский коллектив из Казахстана и г. Владимира (Богуспаев К.К. и др.) выполнил работу по микробиологическому и молекулярно-генетическому анализу вермикомпоста, полученного на основе навоза крупного рогатого скота с использованием компостных червей *Eisenia fetida*. Идентифицированы доминирующие в вермикомпосте виды грибов.

Группа сотрудников (Иванова и др.) из МГУ, Московского государственного университета пищевых производств, Российского государственного аграрного университета провели скрининг лактобацилл, выделенных из разных мест обитания, на способность разрушать пищевые азокрасители тартразин и понсо в различных условиях роста.

Кочеткова О.Ю., Антонова О.Ю. (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино) сумели осуществить совместное инкапсулирование гидрофобных и гидрофильных соединений в один микроконтейнер. Посредством модификации метода послойной сборки противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхности карбонатной частицы и гелеобразования были получены гибридные микрокапсулы.

Исследователями из лаборатории биотехнологии и биоэнергетики НИЦ «Курчатовский институт» представлены два актуальных обзора. И.Н. Саметова, Р.Г. Васильев рассмотрели состояние микрофлоры кожи в условиях воздействия косметическими средствами. При этом учитывался баланс микробиоты, состоящей из комменсальных, симбиотических и патогенных микроорганизмов. Т.А. Гаева совместно с Р.Г. Васильевым проанализировали современное состояние информации по сложной и многоаспектной теме обращения с твердыми коммунальными отходами. Особое внимание в обзоре было уделено технологическому обеспечению переработки отходов в РФ существующими и перспективными возможностями.

В конце номера помещен некролог памяти недавно скончавшегося выдающегося отечественного ученого академика А.С. Спирина.

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

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТА МОДИФИЦИРОВАННОЙ ФОРМЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ЧУМНОГО МИКРОБА С АНАЛИЗОМ ЦЕЛЕВОГО ПРОДУКТА *IN SILICO* И *IN VITRO*

А.А. БУДАНОВА*, И.В. ТУЧКОВ, М.Н. КИРЕЕВ, Н.И. МИКШИС, С.А. БУГОРКОВА

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

Современное развитие биологических наук способствует интенсивному развитию вакцинных технологий, основанных на применении генно-инженерных подходов, что открывает возможность направленного конструирования субъединичных вакцин с использованием рекомбинантных антигенов. Однако при создании вакцинных препаратов нового поколения на основе рекомбинантных белков необходимо учитывать наличие в их составе патоген-ассоциированных молекулярных структур, в частности, Т-клеточных эпитопов. В данном исследовании приведены результаты генно-инженерных работ по получению штаммов-продуцентов нативной и мутантной форм капсульного антигена чумного микроба. Генетические модификации направлены на увеличение растворимости целевого продукта. Для продуцента нативной формы капсульного антигена были оптимизированы условия выращивания, при которых наблюдалось повышение выхода растворимой формы антигена, сопоставимое с выходом его мутантной формы. С применением онлайн-ресурсов, осуществляющих 3D-моделирование белковых молекул «по шаблону», проведено исследование пространственной структуры нативной и модифицированной форм антигена, а также выполнен анализ расположения и структурной целостности важнейших Т-клеточных эпитопов зрелой формы рекомбинантных молекул.

Ключевые слова: вакцины, *Yersinia pestis*, капсульный антиген чумного микроба, рекомбинантные белки, моделирование пространственной структуры белковых молекул.

Введение

Чума представляет собой природно-очаговую энзоотическую болезнь. Природные очаги чумы распространены во многих регионах мира. Человек является случайным хозяином. Выделяют несколько путей передачи данного инфекционного агента. В случае контакта с зараженными грызунами или блохами наблюдается развитие бубонной формы заболевания, которая при отсутствии лечения может переходить в септическую форму или во вторичную легочную чуму. При вдыхании аэрозоля, содержащего возбудитель, развивается чрезвычайно смертельная форма чумы — первично легочная [8], с чем связаны опасения возможного применения данного патогена в качестве потенциального агента биотеррористических атак [11]. Необходимо отметить, что в

настоящее время на территории Российской Федерации зафиксировано 11 природных очагов чумы с общей площадью 253590 кв. км. [1]. В этой связи актуальным является поиск новых средств диагностики, профилактики и лечения данной смертоносной инфекционной болезни.

Одно из основных условий при конструировании средств специфической профилактики заключается в том, что вакцины нового поколения должны стимулировать выработку как гуморального, так и клеточного ответа [8]. При создании субъединичных вакцин в качестве потенциальных мишеней рассматриваются как поверхностные компоненты бактериальной клетки, так и эффекторные молекулы. Наибольшее продвижение в плане доклинических и клинических исследований достигнуто для вакцин на основе рекомбинантных антигенов чумного микроба — капсульного антигена (F1) и компонента системы секреции III типа LcrV. В постгеномный период сведения о Т-клеточных эпитопах антигенов получают на основании ассоциации с генами главного комплекса гистосовместимости человека. К настоящему времени с использованием современных высокопроизводительных технологий в структуре капсульного антигена чумного микроба найдено свыше 20 эпитопов, ассоциированных с развитием Т-клеточного иммунного ответа, в том числе

© 2020 г. Буданова А.А., Тучков И.В., Киреев М.Н., Микшис Н.И., Бугоркова С.А.

* Автор для переписки:

Буданова Ангелина Андреевна

канд. биол. наук, научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов

E-mail: rusrapi@microbe.ru

CD4 T-клеточные эпитопы, ассоциированные с аллелью HLA-DR1 MHC класса II в экспериментах на трансгенных по HLA мышах [5].

Продукция капсульного антигена индуцируется при температуре 37 °C [2]. Антиген F1 кодируется опероном *caf1*, включающим в себя 4 гена: *caf1M* (шаперон), *caf1R* (регулятор транскрипции), *caf1A* (белковый ашер), *caf1* (F1). Ген *caf1* кодирует синтез F1 антигена, представляющего собой капсулоподобную субстанцию, окружающую бактериальную клетку и обладающую антифагоцитарными свойствами, предохраняющую, таким образом, микроорганизм от иммунной системы макроорганизма [2, 4]. Капсульный антиген (F1) чумного микроба представляет собой прототип непилийных органелл, сборка которых опосредуется шапероном Caf1M и ашером Caf1A [10]. Ранее было установлено, что капсула *Y. pestis* построена из соединенных в линейное волокно при участии N-концевой β -цепи субъединиц капсульного антигена [10] за счет комплементарного взаимодействия. Каждая субъединица F1 имеет IgG-подобный домен, состоящий из четырехцепочечного антипараллельного β -листа. Три из четырех β -тяжей относятся к одной субъединице и формируют так называемую «расщелину», в которую при межмолекулярной комплементации заходит NH₂-концевой β -тяж соседней субъединицы. При связывании субъединиц указанным способом формируются волокна F1. В процессе формирования линейного волокна F1 «свободная» β -цепь шаперона Caf1M временно заполняет «расщелину», пока она не будет заменена с помощью белка-инициатора (ашера) внешней мембраны – Caf1A, β -цепью субъединицы [7]. На внешней мембране патогена происходит агрегация F1 в олигомерный белок, формирующий зернистый слой [9]. Однако при конструировании штаммов-продуцентов F1 в результате гиперэкспрессии гена *caf1* в гетерологичной системе такой, как *E. coli*, данный сложный процесс нарушается, приводя к неконтролируемой агрегации субъединиц F1 в нерастворимые тельца включения [7]. Предложен способ получения растворимой формы капсульного антигена с применением генно-инженерных подходов. Суть его заключается в том, что при перемещении свободной NH₂-концевой β -цепи F1 на COOH-конец происходит изменение конформации белковой молекулы таким образом, что перемещенная β -цепь заполняет «расщелину» собственной субъединицы без участия системы шаперон-ашер [7].

Целью данного исследования было улучшение антигенных характеристик капсульного антигена чумного

микроба для последующего его использования в создании диагностических и профилактических препаратов.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования. Источником нативной формы гена *caf1* служил штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Для трансформации полученных рекомбинантных плазмид использовали коммерческие штаммы *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США) и *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, США).

Аmplификация нативного и мутантного гена *caf1*, клонирование выделенных генов. В качестве вектора для клонирования была выбрана коммерческая плаزمид рЕТ32а (Novagen, США). Амплификацию гена *caf1* из штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для включения в рЕТ-вектор осуществляли с применением ПЦР. Результаты ПЦР регистрировали на гель-документирующей системе E-Box (Vilber Lourmat, Франция) с помощью программного обеспечения Vision-Capt (Vilber Lourmat, Франция). В качестве контроля молекулярной массы использовали коммерческие маркеры O'Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder и Fast Ruler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, США). В используемую плазмиду интегрировали полноразмерные гены, начиная со стартовой корона. На С-конце полинуклеотидной последовательности генов при этом удаляли стоп-кодон, что позволяло получить белковый продукт, меченный гистидиновой меткой, расположенной на С-конце полипептида.

Для амплификации и дальнейшего клонирования полноразмерной последовательности гена *caf1* размером 513 п.н. использовали праймеры:

Caf1_рЕТ32_EcoRV_F1: CAGATATCATGA
AAAAAATCAGTTCCGTTATCG

Caf1_HisC_XhoI_R: CACTCGAGTTGGTTA
GATACGGTTACGGTTACAG

Подчеркиванием в составе последовательности праймеров выделены сайты узнавания ферментов рестрикции. Температуру отжига праймеров определяли в программе Vector NTI. Олигонуклеотидные праймеры синтезировали в лаборатории генодиагностических препаратов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Матрицей для получения мутантного гена *caf1mut* послужила нативная форма гена *caf1*. На первом этапе получали промежуточный продукт, у которого 14 аминокислотных остатков были удалены на N-конце с одно-

временным переносом 7 N-концевых аминокислотных остатков на C-конец. На первом этапе нами применялась пара праймеров:

Caf1mut_pET32_EcoRV_F1: CCATCTGATAT
CATGGAACCAGCCCCGCATCACTC

Caf1mut_R1: **GGTGCTTGCAGTTAAATCT**
GCTGCAGATTGGTTAGATACGGTTACGGTTA
CAGC

В составе прямого праймера имеется сайт узнавания фермента рестрикции *EcoRV* (выделено подчеркиванием), в составе обратного — курсивом выделен аминокислотный линкер, соединяющий участок праймера, комплементарный первым 21 нуклеотидом на 5'-конце (выделено жирным шрифтом) и 3'-концевую последовательность гена *caf1*.

Выделенный из геля и очищенный при помощи коммерческого набора Ultrafree®-DA DNA Extraction from agarose (Millipore, Ирландия) ПЦР-продукт подвергли 2-й стадии ПЦР с применением праймеров:

Caf1mut_pET32_EcoRV_F1: CCATCTGATAT
CATGGAACCAGCCCCGCATCACTC

Caf1mut_Xhol_R2: **CGTCTCGAG**
AACAAGAGTTGCCGTTGCAAGTG
GTGCTTGCAGTTAAATCTGC

В составе пар праймеров присутствуют сайты узнавания ферментов рестрикции (выделено подчеркиванием), первые 5'-концевые 42 н.п. (выделены жирным шрифтом).

Реакционную смесь для постановки реакции ПЦР для гена *caf1* готовили по прописи: реакционный буфер (десятикратный) — 2,5 мкл, раствор dNTP 2,5 ммоль — 2,5 мкл, праймер *Caf1_HisC_VamHI_F* 10 пмоль/мкл — 1 мкл, праймер *Caf1_HisC_Xhol_R* 10 пмоль/мкл — 1 мкл, MgCl₂ 0,25 моль — 1,0 мкл, фермент Taq-полимераза 5 ед/мкл — 0,2 мкл, исследуемая проба ДНК 100 нг/мкл — 10 мкл, вода деионизированная — 6,8 мкл. Общий объем реакционной смеси — 25 мкл на 1 пробу. Реакцию осуществляли в микроцентрифужных пробирках объемом 200 мкл на термоциклере Mastercycler nexus (Eppendorf, Германия).

Аmplification гена *caf1* проводили по схеме: 95 °C — 3 мин (1 цикл); 25 циклов: 95 °C — 30 сек, 55 °C — 30 сек, 72 °C — 1 мин 30 сек; 72 °C — 3 мин.

Условия амплификации и состав реакционной смеси для гена *caf1mut* были аналогичны гену *caf1* как на первом, так и на втором этапе.

Полученные ПЦР-продукты были выделены из геля и очищены с помощью коммерческого набора Ultrafree®-DA DNA Extraction from agarose (Millipore,

Ирландия). Препараты хранили при температуре минус 20 °C до проведения дальнейших генно-инженерных работ.

Лигирование и трансформация. Полученные ПЦР-фрагменты и векторы обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции и лигировали T4-ДНК-лигазой (Thermo Scientific, США) с использованием прилагаемых буферов согласно рекомендациям производителя.

Лигазными смесями трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США). Селекцию трансформантов осуществляли на среде с ампициллином.

Наличие в рекомбинантной плазмиде вставки определяли на основании результатов ПЦР с праймерами на клонируемые гены. Из изолированных трансформантов выделяли плазмидную ДНК с применением коммерческого набора Gene Jet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США), следуя инструкции производителя, и трансформировали компетентные клетки экспрессирующего штамма *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, США). Отбор клонов проводили по маркеру резистентности к ампициллину.

Культивирование экспрессирующих штаммов, полученных на основе коммерческого штамма *E. coli* BL21 (DE3). Штаммы *E. coli* BL21 (DE3) с рекомбинантными плазмидами, содержащими клонированный ген, выращивали на LB-агаре с добавлением селективного антибиотика (ампициллин в концентрации 50 мкг/мл). Бактериальную суспензию подращивали при 37 °C в LB бульоне в течение 2 часов до достижения A₆₆₀ = 0,6 на шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan, Латвия) при 250 об/мин. Затем к культуре, находящейся в логарифмической фазе роста, добавляли индуктор изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) (Invitrogen, США) до конечной концентрации 0,1 мМ и дополнительно выращивали еще в течение 3,5 часов при 25 °C. По истечении указанного времени бактериальную суспензию центрифугировали при 4000 g и 10 °C в течение 10 минут. Надосадок удаляли. Осадок клеток ресуспендировали в 8 мл Native Binding Buffer и подвергали дезинтеграции на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep 150 (Великобритания). Дезинтеграцию осуществляли на ледяной бане при 44 кГц в режиме трех циклов: 10 секунд — озвучивание/10 секунд — охлаждение. Для отделения клеточного дебриса дезинтегратор центрифугировали при 13000 g 10 минут. Супернатант переносили в другие пробирки и сохраняли для дальнейших исследований при +4 °C. Бактериальный осадок отмывали в фосфатном буфере при 13000 g в течение 5 минут и сохраняли при +4 °C.

Очистка рекомбинантного белка с использованием ProBond™ Purification System. Подготовку хроматографических колонок, содержащих ионообменную смолу, и очистку белка с аффинной меткой проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя коммерческого набора ProBond™ Purification System (Invitrogen, Германия).

Перед проведением работ по очистке рекомбинантных белков подготавливали рабочие растворы из ингредиентов набора ProBond™ Purification System и осуществляли подготовку хроматографической колонки для очистки белковых препаратов в нативных условиях в соответствии с прилагаемой инструкцией фирмы-производителя. В подготовленные колонки вносили 8 мл лизата и проводили связывание белка с носителем в течение 30 мин, периодически перемешивая содержимое колонки. По окончании указанного времени смолу давали отстояться и удаляли супернатант. Далее в колонку вносили 8 мл нативного отмывочного буфера, перемешивали содержимое и оставляли на 5–10 мин для осаждения смолы. Процедуру отмывки повторяли еще 3 раза. В установленную вертикально хроматографическую колонку вносили 12 мл буфера для элюции белков в нативных условиях и собирали очищенный белковый препарат в отдельные пробирки. Для дальнейших исследований полученные белковые препараты сохраняли при +4 °С.

Концентрацию очищенных при помощи ионнообменной хроматографии препаратов нативной и мутантной формы капсульного антигена измеряли на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific™) при длине волны 280 нм. Измерения осуществляли против нативного отмывочного буфера.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле. Белковые препараты, полученные как на подготовительном этапе, так и на этапе ионообменной хроматографии, подвергали исследованию методом денатурирующего электрофореза в 10% ПААГ. Электрофоретическое фракционирование белковых препаратов проводили в вертикальной камере Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad). Белки визуализировали окрашиванием гелей в растворе Кумасси R-250. Результаты электрофоретического разделения регистрировали на гелъдокументирующей системе E-Box (Vilber Lourmat, Франция).

Дот-анализ. Иммунодот-анализ осуществляли на нитроцеллюлозной мембране (Millipore, фильтр НА, 0,45 мкм). В центр квадрата со стороной 5 мм, очерченного на нитроцеллюлозной мембране, наносили 1 мкл антигенного препарата. В качестве отрицательного

контроля применяли препарат протективного антигена сибирской язвы. Для увеличения степени адсорбции антигенов образец фиксировали 1 час при комнатной температуре. Для исключения участков неспецифической сорбции мембрану выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре в 3%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma). Далее мембрану погружали в раствор коммерческих моноклональных антител (*Yersinia pestis* F1 antigen antibody (VPF19), Novus Biologicals, США), разведенный в соотношении 1:2000, в соответствии с рекомендациями производителя. Рабочий раствор моноклональных антител включал в себя также 0,01% БСА и 0,02 Твин-20. Мембрану инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут в растворе моноклональной сыворотки. Для визуализации результата мембрану инкубировали в растворе 15 нм золотых сферических наночастиц, конъюгированных с протеином G (Sigma).

Анализ *in silico* нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и конструирование праймеров для амплификации клонируемого фрагмента ДНК проводили с помощью пакета программ MEGA 6.0. Построение 3D модельных структур осуществляли с применением онлайн-серверов I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) и Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>). Поиск и анализ T-клеточных эпитопов были выполнены при помощи ресурса открытого доступа — базы данных иммунных эпитопов IEDB (Immune Epitope Database and Analysis Resource, <https://www.iedb.org/>).

Результаты и обсуждение

Для получения штаммов-продуцентов нативной (F1) и растворимой формы (F1mut) капсульного антигена использовали экспрессирующую систему на основе штамма *E. coli* BL21 (DE3) и плазмиды pET32a. На рисунке 1 представлена схема получения мутантного гена *caf1* (*caf1mut*), включающая в себя 2 этапа. Конечный продукт (F1mut) характеризовался тем, что на NH₂-конце полипептида было удалено 14 аминокислотных остатков, а на C-конце был добавлен, в общей сложности, 21 аминокислотный остаток с N-конца. Проведенные нами исследования с применением базы данных иммунных эпитопов IEDB (Immune Epitope Database and Analysis Resource, <https://www.iedb.org/>) в сочетании с анализом представленных литературных данных позволили сделать вывод о наличии в структуре растворимой

формы капсульного антигена всех Т-клеточных эпитопов, характерных для зрелой формы F1, так как первые 20 аминокислот в аминокислотной последовательности Caf1, отсутствующие в составе мутантной формы капсульного антигена, представляют сигнальную последовательность и отсутствуют в структуре зрелой формы капсульного антигена [3].

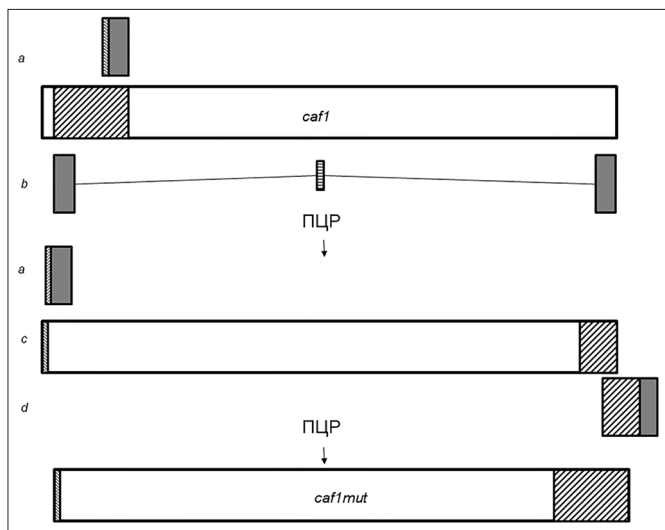


Рис. 1. Этапы получения мутантного гена (*caf1mut*), кодирующего синтез модифицированного капсульного антигена: *a* — прямой праймер, содержащий в нуклеотидной последовательности сайт рестрикции *EcoRV*; *b* — обратный праймер, состоящий из двух участков, соединенных коротким линкером; *c* — промежуточный продукт, у которого 14 аминокислотных остатков удалено на N-конце и 7 N-концевых аминокислотных остатков перенесено на C-конец; *d* — обратный праймер, содержащий триплеты, несущие информацию о 14 NH₂-концевых аминокислотных остатках и сайт узнавания для фермента рестрикции *XhoI*

По нашим данным, в структуре растворимой формы капсульного антигена при осуществлении указанных манипуляций происходит перенос Т-клеточного эпитопа на С-конец полипептидной цепи. При этом сохраняется иммунодоминантный эпитоп, идентифицированный вблизи С-конца молекулы F1 (Caf1_{141–160}), имеющий перекрывающуюся последовательность с областью Caf1_{131–150}. По литературным данным, последовательность Caf1_{141–160} является участком зрелой формы белка F1, предсказанным сервером IEDB по консенсусной последовательности как Т-клеточный эпитоп [5].

Одним из подходов, направленных на увеличение выхода белков в растворимой форме, является изменение стандартных условий культивирования продуцентов рекомбинантных белков, в частности, понижение темпе-

ратуры культивирования [6]. В данной работе нами были оптимизированы условия культивирования продуцентов нативной и мутантной формы капсульного антигена, при которой выход целевых растворимых продуктов был наибольшим и примерно одинаковым (данные не приводятся). Индукцию синтеза целевых продуктов вызывали добавлением в питательную среду изопропил-β-D-тиогалактозида до конечной концентрации 0,1 мМ; температура инкубации бактериальных клеток снижалась до 25 °С. Выращивание осуществляли в течение 3,5 часов. Таким образом, так как продукты трансляции генов *caf1* и *caf1mut* обнаруживались преимущественно в супернатанте отмытых от культуральной среды бактериальных клеток, что видно на рисунке 2, было решено проводить дальнейшую очистку целевых белков в нативных условиях, не требующих полного разрушения бактериальных клеток.

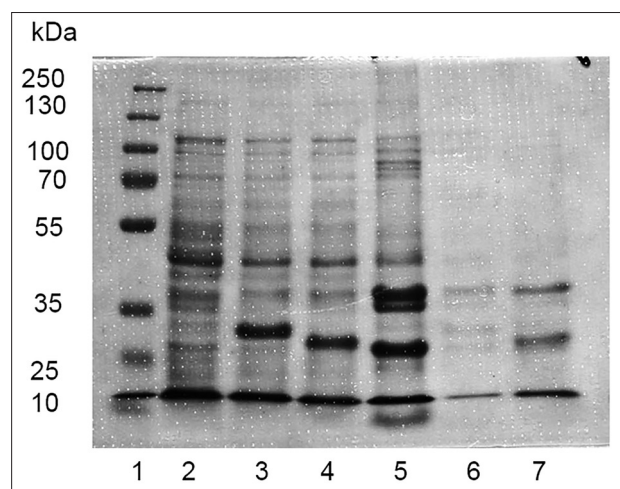


Рис. 2. Сравнение концентрации мутантного и нативного капсульного антигена в супернатанте и осадке отмытых от культуральной среды клеток *E. coli* BL21(DE3): 1 — маркер молекулярных масс; 2 — контроль (супернатант *E. coli* BL21(DE3)); 3 — супернатант *E. coli* BL21(DE3)/pET32cafmut; 4 — супернатант *E. coli* BL21(DE3)/pET32caf; 5 — контроль (осадок *E. coli* BL21(DE3)); 6 — осадок *E. coli* BL21(DE3)/pET32cafmut; 7 — осадок *E. coli* BL21(DE3)/pET32caf

Электрофореграмма белковых препаратов F1 и F1mut, очищенных на никель-хелатном сорбенте методом колоночной хроматографии, представлена на рисунке 3 (трек 6, 7). Концентрация очищенного при помощи ионообменной хроматографии препарата F1mut и F1 составила 0,4 мг/мл и 0,35 мг/мл. Оба препарата были элюированы с хроматографической колонки в объеме 8 мл.

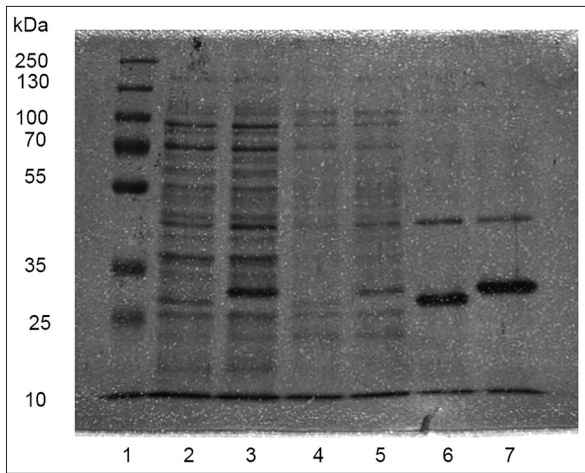


Рис. 3. Этапы очистки белковых препаратов на никель-хелатном сорбенте: 1 – маркер молекулярных масс; 2 – фракция, не связавшаяся с сорбентом при очистке препарата F1; 3 – фракция, не связавшаяся с сорбентом при очистке препарата F1mut; 4 – фракция, собранная при промывке сорбента, связанного с F1, отмывочным буфером; 5 – фракция, собранная при промывке сорбента, связанного с F1mut, отмывочным буфером; 6 – очищенный на никель-хелатном сорбенте препарат F1; 7 – очищенный на никель-хелатном сорбенте препарат F1mut

Отмечено различие в молекулярных массах модифицированной и исходной форм F1 при соблюдении одинаковых условий культивирования рекомбинантных штаммов-производителей. Наблюдаемое различие в молекулярных массах растворимой и нативной формы F1 объясняется различиями в длине полипептидных цепей. Так, F1mut содержит в своем составе аминокислотный линкер, состоящий из 2 аминокислот, и дублированный T-клеточный эпитоп на C-конце.

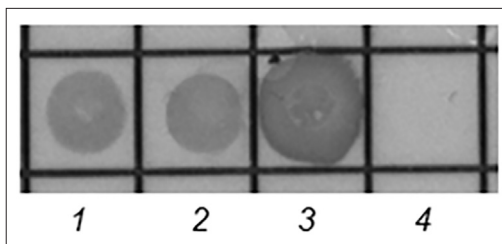
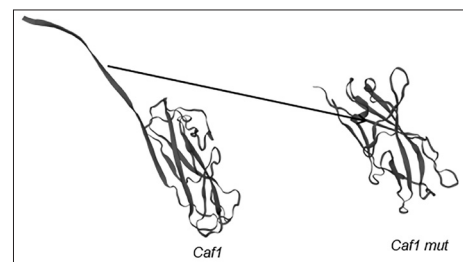


Рис. 4. Результаты дот-иммуноанализа: 1 – очищенный на никель-хелатном сорбенте препарат F1; 2 – очищенный на никель-хелатном сорбенте препарат F1mut; 3 – препарат капсульного антигена F1, выделенный из супернатанта бульонной культуры *Y. pestis* путем одноэтапной колоночной гельхроматографии на биогеле A-50m (положительный контроль); 4 – препарат протективного антигена сибиреязвенного микроба (отрицательный контроль)

В дот-анализе (рис. 4) отмечено практически равное по интенсивности взаимодействие очищенных на никель-хелатном сорбенте препаратов F1 и F1mut с моноклональными антителами (*Yersinia pestis* F1 antigen antibody (VPPF19), Novus Biologicals, США), что, в свою очередь, указывает на наличие общих эпитопов, обусловленных аминокислотной последовательностью.

Проведенное гомологичное моделирование с применением онлайн-ресурсов I-Tasser (рис. 5b) и Swiss-model (рис. 5a) подтвердило, что изменения пространственной структуры антигена затрагивают только N- и C-концевую область биополимера, не перекрывая T-клеточные эпитопы. При построении 3D модельных структур продукта трансляции мутантного гена *caf1* онлайн-сервером I-Tasser программой было подобрано 10 наиболее близких гомологов, в качестве каркаса программой была выбрана определенная при помощи рентгеноструктурного анализа и аннотированная последовательность белка F1.



a



b

Рис. 5. Пространственное моделирование нативной и модифицированной форм F1: a – моделирование с применением онлайн-ресурса Swiss-model; b – моделирование с применением онлайн-ресурса I-Tasser

Заключение

Таким образом, с использованием генно-инженерных подходов и структурного анализа *in silico* проведены эксперименты по повышению растворимости F1 чумного микроба с сохранением потенциальных T-клеточных эпитопов. Проведены работы по подбору условий культивирования

продуцента нативной формы капсульного антигена, при которых его выход сопоставим с выходом F1mut и синтезируемый продукт представлен большей частью в растворимой форме. Необходимо отметить, что прогнозирование иммунодоминантных эпитопов и определение конформационной стабильности рекомбинантных молекул важно как на этапе поиска новых иммуногенных мишеней, так и на этапе оценки протективных и иммуногенных свойств рекомбинантных антигенов в экспериментах на лабораторных животных.

Литература

1. Попов Н.В., Карнаухова И.Г., Пакскина Н.Д., Ерошенко Г.А. и др. Оценка современной эпидемической обстановки в природных очагах чумы мира. Повышение эффективности эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации и прогноз их эпизоотической активности на 2019 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 1. — С. 81–88. doi: 10.21055/0370-1069-2019-1-81-88.
2. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis // Infect. Immun. — 2002. — Vol. 70(3). — P. 1453–1460. doi: 10.1128/IAI.70.3.1453-1460.2002.
3. Galyov E.E., Smirnov O.Y., Karlyshev A.V., Volkovoy K.I., et al. Nucleotide-sequence of the yersinia-pestis gene encoding f1 antigen and the primary structure of the protein: putative T-cell and B-cell epitopes // FEBS Lett. — 1990. — Vol. 277. — P. 230–232.
4. Karlyshev A.V., Galyov E.E., Abramov V.M., Zav'yalov V.P. Caf1R gene and its role in the regulation of capsule formation of *Y. pestis* // FEBS Lett. — 1992. — Vol. 305(1). — P. 37–40.
5. Musson J.A., Ingram R., Durand G., et al. Repertoire of HLA-DR1-restricted CD4 T-cell responses to capsular Caf1 antigen of *Yersinia pestis* in human leukocyte antigen transgenic mice // Infect Immun. — 2010. — Vol. 78(10). — P. 4356–4362. doi: 10.1128/IAI.00195-10.
6. Qing G., Ma L.C., Khorchid A., Swapna G.V., et al. Gold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli* // Nat. Biotechnol. — 2004. — Vol. 22. — P. 877–882.
7. Tao P., Mahalingam M., Kirtley M.L. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines // PLoS Pathog. — 2013. — Vol. 9(7). — e1003495.
8. Verma S.K., Tuteja U. Plague vaccine development: current research and future trends // Front. Immunol. — 2016. — Vol. 7. — P. 602. doi: 10.3389/fimmu.2016.00602.
9. Wang T., Qi Z., Wu B. et al. A new purification strategy for fraction 1 capsular antigen and its efficacy against *Yersinia pestis* virulent strain challenge // Protein Expression and Purification. — 2008. — Vol. 61(1). — P. 7–12. doi:10.1016/j.pep.2008.05.003.
10. Zavialov A.V., Berglund J., Pudney A.F., et al. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation // Cell. — 2003. — Vol. 113. — P. 587–596.
11. Zilinskas R.A. The anti-plague system and the Soviet biological warfare program // Crit. Rev. Microbiol. — 2006. — Vol. 32. — P. 47–64. doi:10.1080/10408410500496896.

GENE-ENGINEERING DESIGN OF THE PRODUCER OF MODIFIED FORM OF CAPSULE ANTIGEN *YERSINIA PESTIS* WITH ANALYSIS OF THE TARGET PRODUCT *IN SILICO* AND *IN VITRO*

A.A. BUDANOVA, I.V. TUCHKOV, M.N. KIREEV, N.I. MIKSHIS, S.A. BUGORKOVA

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

The modern development of biological sciences contributes to the intensive development of vaccine technologies based on the use of genetic engineering approaches, which opens up the possibility of directed construction of subunit vaccines using recombinant antigens. However, when creating a new generation of vaccine preparations based on recombinant proteins, it is necessary to take into account the presence of pathogen-associated molecular structures in their composition, in particular T-cell epitopes. This study presents the results of genetic engineering to obtain producer strains of the native and mutant forms of the plague microbe capsular antigen. Genetic modifications are aimed at increasing the solubility of the target product. For the producer of the native form of the capsular antigen, growing conditions were optimized under which an increase in the yield of the soluble form of the antigen was observed, comparable to the yield of its mutant form. Using online resources that perform 3D modeling of protein molecules «according to the pattern», the spatial structure of the native and modified forms of the immunogenic antigen is studied, and the location and structural integrity of the most important T-cell epitopes of the mature form of recombinant molecules are analyzed.

Keywords: vaccines, *Yersinia pestis*, plague microbe capsular antigen, recombinant proteins, modeling of the spatial structure of protein molecules.

РАЗРАБОТКА ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ ВЫСУШИВАНИЯ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТАРНОГО АНТИГЕННОГО ТУЛЯРЕМИЙНОГО ДИАГНОСТИКУМА

А.Г. КОШКИДЬКО*, С.А. КУРЧЕВА, И.В. ЖАРНИКОВА, О.Л. СТАРЦЕВА

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

Описана разработка оптимальных сред высушивания для получения диагностикума эритроцитарного антигенного туляремиального сухого. Решение поставленной задачи реализовалось посредством использования стабилизирующих защитных сред с различным составом, с последующей сублимационной сушкой препарата и постановкой контрольных исследований. Представлены результаты определения стабильности лиофилизированного препарата при хранении и транспортировании в различных климатических условиях.

Ключевые слова: туляремия, среда высушивания, стабильность препаратов, реакция непрямой гемагглютинации, лиофилизация.

Введение

Туляремия — бактериальное природно-очаговое зоонозное инфекционное заболевание с разнообразными механизмами передачи возбудителя, клинически характеризуется интоксикацией, лихорадкой и поражением лимфатических узлов [4]. Природные очаги туляремии имеются практически на всей территории Российской Федерации, их эпизоотическая активность ежегодно подтверждается обнаружением значительного числа положительных на туляремию проб из объектов внешней среды. В последние десятилетия вспышки туляремии и спорадические случаи имели место во всем мире со специфическими и эпидемиологическими признаками. В Российской Федерации было зарегистрировано 1944 случая заражения туляремией, в 52 субъектах — эпизоотические проявления инфекции различной степени интенсивности. Эта инфекция представляет собой серьезную проблему как для общественного здравоохранения, так и военную проблему, поскольку возбудитель туляремии отнесен Центром по контролю и профилактики заболеваний США (US Centers for Disease Control and Prevention)

к категории А потенциальных агентов биологической угрозы [2, 7, 14].

Стремительное развитие биотехнологии в последние годы привело к появлению многочисленных новых методов исследования, однако огромное значение имеет хорошо известная реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), заключающаяся в том, что эритроциты, связавшие серологически активный компонент, приобретают свойства агглютинироваться гомологичным серологически активным анти-компонентом. Такой метод выявления первичного взаимодействия антиген-антитело обладает весьма высокой чувствительностью и простотой постановки [3, 12]. Однако эритроцитарные препараты чувствительны к внешним факторам, а значит, любые, даже незначительные отклонения от температурного режима, возникшие при хранении или транспортировке, могут привести к частичной или полной потере их биологической активности. В связи с этим возникает необходимость в разработке способов стабилизации эритроцитарных диагностикумов. В данном аспекте одним из решений проблемы является разработка лиофилизированной формы эритроцитарных диагностикумов. В лиофилизированных препаратах резко замедляются или прекращаются биохимические реакции, в результате чего они становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия и сохраняют первоначальные свойства в течение длительного периода хранения.

Следует отметить, что до настоящего времени не существует универсальных принципов подбора защитных сред (криопротекторов). Выбор криопротектора

© 2020 г. Кошкидько А.Г., Курчева С.А., Жарникова И.В., Старцева О.Л.

* Автор для переписки:

Кошкидько Александра Геннадьевна
младший научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
E-mail: koshidko-94@mail.ru

осуществляется эмпирически, индивидуально для каждого препарата, обеспечивая получение качественного сухого материала с сохранением нативности всех компонентов, входящих в состав. Использование защитной среды позволяет реализовать возможность длительного использования диагностикомов после восстановления препарата без возникновения микробной контаминации, а также предотвращение спонтанной агглютинации. Включение в состав среды раствора неионного детергента обеспечивает хорошую растворимость препарата и проведение реакции непрямой гемагглютинации с использованием изотонического раствора хлористого натрия, исключив из постановки реакции разводящую жидкость. Качество лиофилизатов оценивается по следующим основным показателям: характерная структура высушенного материала без признаков микрооттаивания; потеря в массе при высушивании, не превышающая 3%; быстрая растворимость препарата (1–2 мин); исходная вязкость препарата после растворения; рН среды; сохранение активности, специфичности и других свойств препаратов [8, 9].

Цель настоящей работы: разработка защитной среды высушивания для стабилизации эритроцитарного антигенного туляремийного диагностикума.

Материалы и методы

При выполнении работы использовали 5%-ный диагностикум эритроцитарный антигенный туляремийный, входящий в состав Набора реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, ФСР 2011/10270 от 17.02.2014 г.).

В качестве вспомогательных веществ для подготовки защитных сред применяли поливинилпирролидон (ПВП) (Sigma-Aldrich, США), обладающий выраженными хладозащитными свойствами [5]; декстран (ApplChem, Германия), проявляющий свойства экзоцеллюлярного криопротектора и дополнительно защищающий клетку при замораживании; сахарозу (ГОСТ 5833-75), позволяющую понизить точку замерзания воды и замедлить ее кристаллизацию, изменяя точку эвтектики, влияющую на скорость сушки и конечную остаточную влажность; желатин в качестве коллоидного компонента (ГОСТ 23058-89) [6]. Для упрощения постановки реакции в состав защитной среды высушивания был включен раствор твин 80 (Sigma-Aldrich, США), позволяющий при постановке РНГА отказаться от ис-

пользования разводящей жидкости. В качестве консерванта использовали азид натрия (Helicon) [10].

Лиофилизацию экспериментальных серий эритроцитарного диагностикума туляремийного антигенного проводили с помощью лиофильной установки камерного типа Alpha 2-4 (Martin Christ, Германия). Постановку РНГА проводили макрометодом по стандартной методике [13].

Для контроля специфичности и специфической активности лиофилизированного диагностикума использовали коммерческие сыворотки производства ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора: сыворотка диагностическая туляремийная сухая для реакции агглютинации (РА) (ФСР 2011/10029 от 17.12.2013 г.), сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (ФСР 2007/00468 от 19.03.2013 г.), сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая для реакции агглютинации (ФСР 2012/13323 от 11.04.2012 г.) и набор реагентов «Сыворотки диагностические сальмонеллезные адсорбированные О-поливалентные для реакции агглютинации» производства ЗАО «ЭКОлаб» (РЗН 2017/5914 от 06.07.2017 г.).

Срок годности и условия хранения устанавливали в ходе изучения стабильности препарата для диагностики *in vitro* в масштабе реального времени в соответствии с нормативными документами [1, 11].

Результаты и обсуждение

Для достижения поставленной цели исследования была проведена серия опытов с разными составами криопротекторов, содержащих растворы следующих ингредиентов: № 1 — декстран (6%) в изотоническом растворе NaCl с добавлением твин 80 (2%) и азида натрия; № 2 — поливинилпирролидон (ПВП) (3% с добавлением твин-80 (2%) и азида натрия; № 3 — ПВП (3%) с добавлением сахарозы (15%), твин 80 (2%) и азида натрия; № 4 — сахароза (10%), желатин (1%), твин 80 (2%) и азид натрия. В качестве контроля лиофилизированных экспериментальных серий использовали набор реагентов «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» жидкий (№ 5).

Приготовленный в соответствии с промышленным регламентом 5% диагностикум эритроцитарный антигенный туляремийный центрифугировали при 3000 об./мин в течение 15 мин, образовавшийся осадок ресуспендировали в растворах сред высушивания до образования

10% взвеси. Защитные среды готовили непосредственно перед использованием.

Каждую полученную серию 10% эритроцитарного антигенного диагностикума в соответствующей среде высушивания разливали в ампулы, замораживали в морозильной камере в течение 16–18 ч при температуре минус 40 °С и лиофилизировали в соответствии с разработанным протоколом сублимационного высушивания. Ампулы с препаратом запаивали в среде атмосферного воздуха и хранили при температуре от 2 до 8 °С.

Для стандартизации полученных экспериментальных серий лиофилизатов (№ 1–4) выбраны показатели, по которым следует контролировать качество препарата после получения и в процессе хранения. К данным показателям относятся: внешний вид, регидратируемость (растворимость лиофилизата), подлинность (чувствительность и специфичность).

Внешний вид лиофилизатов оценивали визуально. Все полученные серии имели вид таблетки коричневого цвета, без признаков микрооттаивания. При растворении в течение 1 мин образовывалась гомогенная взвесь коричневого цвета. При отстаивании диагностикумов в течение 2–3 ч наблюдалось образование бесцветной прозрачной надосадочной жидкости и осадка коричневого цвета, разбивающегося при встряхивании.

Для определения подлинности полученные диагностикумы растворяли в 1 мл изотонического раствора

NaCl, полученную взвесь доводили до конечного рабочего разведения 2,5% (в макроварианте).

Так как для проведения контроля использовали набор реагентов «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» жидкий, постановку реакции параллельно проводили с использованием разводящей жидкости (раствор твин 80) в соответствии с инструкцией по применению диагностикума эритроцитарного антигенного туляремийного.

Перед постановкой реакцией диагностикум встряхивали до образования равномерной взвеси.

В качестве положительного контроля (для определения чувствительности) использовали сыворотку туляремийную в разведении 1:50.

Учет результатов осуществляли визуально по степени агглютинации эритроцитов через $2,5 \pm 0,5$ ч (предварительный) и 21 ± 3 ч (окончательный): результат считали положительным, если эритроциты выпадали на дно лунок равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее $2/3$ диаметра сферической поверхности в лунке (в ряде случаев возможно фестончатое оплывание краев агглютината). При отрицательном результате эритроциты выпадают на дно лунки в виде «пуговики» или узкого колечка с ровным краем. В контрольных лунках результат должен быть отрицательным.

В таблице 1 приведены результаты испытаний чувствительности и специфичности полученных серий.

Таблица 1

Результаты испытаний экспериментальных серий эритроцитарного антигенного туляремийного диагностикума в РНГА

| № серии | Описание (внешний вид лиофилизата) | Растворимость лиофилизата / внешний вид после регидратации | Чувствительность | | Специфичность* |
|---------|---|--|-------------------|-----------------|--------------------------|
| | | | 0,9% раствор NaCl | Раствор твин 80 | |
| 1 | Таблетка коричневого цвета, без признаков микрооттаивания | В течение 1 мин / Гомогенная взвесь коричневого цвета | 1:25600 | 1:25600 | Агглютинация отсутствует |
| 2 | Таблетка коричневого цвета, без признаков микрооттаивания | В течение 1 мин / Равномерная взвесь коричневого цвета | 1:12800 | 1:12800 | Агглютинация отсутствует |
| 3 | Таблетка коричневого цвета, без признаков микрооттаивания | В течение 1 мин / Равномерная взвесь коричневого цвета | 1:3200 | 1:800 | Агглютинация отсутствует |
| 4 | Таблетка коричневого цвета, без признаков микрооттаивания | В течение 1 мин / Равномерная взвесь коричневого цвета | 1:25600 | 1:25600 | Агглютинация отсутствует |
| 5 | Гомогенная взвесь красно-коричневого цвета | - | - | 1:25600 | Агглютинация отсутствует |

Примечания: * – Для контроля специфичности использовали коммерческие сыворотки:

1. Сыворотка диагностическая холерная 01 адсорбированная сухая (ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора).
2. Сыворотка поливалентная сальмонеллезная адсорбированная сухая О-для РА (А, В, С, Д, Е) (ЗАО «ЭКОлаб»).
3. Сыворотка диагностическая бруцеллезная поливалентная жидкая (ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора).

При изучении стабильности основных показателей качества препаратов для диагностики *in vitro* учитывают температуры различных климатических зон, в которых предполагается их реализация и использование. После проведения контрольных исследований полученных экспериментальных серий диагностикумов, осуществляли отбор образцов с наилучшими показателями чувствительности и специфичности (№ 1, 4).

Образцы в потребительской упаковке хранили при регламентированной температуре от 2 до 8 °С, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30±2 °С и минус 18 °С соответственно. Исследования проводили через каждые три месяца на протяжении всего периода испытаний в течение заявленного срока годности.

Для каждой постановки контрольных испытаний использовали по три образца из серии. За один образец принимали содержимое одного набора. При постановке РНГА макрометодом в контролируемых образцах отмечалось полное сохранение первоначальных физико-химических свойств препарата, его чувствительности и специфичности. Отрицательного влияния вышеуказанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено. Активность диагностикума эритроцитарного антигенного туляремийного сухого с контрольной сывороткой туляремийной в РНГА составила 1:25600. По совокупности полученных результатов при исследовании стабильности показателей качества лиофилизированных форм диагностикумов доказана возможность его транспортирования в различных климатических условиях с последующим хранением в процессе использования согласно эксплуатационной документации производителя.

Заключение

Проведенные исследования показали, что при получении лиофилизированных препаратов с использованием разработанных защитных сред высушивания наиболее эффективными были варианты № 1, 4, позволяющие предотвратить агрегацию эритроцитов, сохранить первоначальные свойства диагностикума эритроцитарного антигенного туляремийного в течение заявленного срока годности, независимо от температурного режима. Введение в состав сред 2%-ного раствора неионного детергента позволило исключить из постановки реакции специальную разводящую жидкость. Чувствительность эритроцитарных диагностикумов, изготовленных с применением выбранных защитных сред высушивания, на каждом этапе проверки составила 1:25600, при отсут-

ствии агглютинации с гетерологичными сыворотками, что удовлетворяет требованиям нормативной документации.

Поливинилпирролидон, применяемый в качестве криопротектора в вариантах № 2, 3 эритроцитарных диагностикумов, не обнаружил достаточно значимых защитных свойств.

Литература

1. ГОСТ Р ИСО 23640-2015. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*. — М.: Госстандарт. 2015. — 7 с.
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году» [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=12053.
3. Жарникова И.В., Ефременко В.И., Жарникова Т.В., Курчева С.А., Кальной С.М., Ефременко Д.В., Исакова А.А., Инденбом А.В. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии (ЖМЭИ). — 2019. — № 4. — С. 38.
4. Инфекционные, зоонозные, гельминтозные заболевания [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://alternativa-sar.ru/tehnologu/mikrobiologiya/vasyukova-a-t-mikrobiologiya-fiziologiya-pitaniya-sanitariya-i-gigiena/1952-1-3-infektsionnye-zoonoznye-gelmintoznye-zabolevaniya>.
5. Костяев А.А., Мартусевич А.К., Андреев А.А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья) // Научное обозрение. Медицинские науки. — 2016. — № 6 — С. 54–74.
6. Котлов С.А. Оптимизация криопротекторов для лиофилизации вакцинных штаммов *Salmonella* // Биологический журнал: эл. научный журнал. — 2019 — № 5(5). URL: <https://bio-j.ru/archive/5/124> (дата обращения: 08.07.2020). DOI: 10.32743/2658-6460.2019.5.5.124.
7. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н. и др. Туляремия: актуальные вопросы и прогноз эпидемической ситуации на территории Российской Федерации в 2018 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2018. — № 1. — С. 22–29.
8. Курчева С.А., Жарникова И.В., Старцева О.Л., Тюменцева И.С., Жданова Е.В., Афанасьев Е.Н., Кошкидько А.Г., Геогджаян А.С., Гаркуша Ю.Ю., Кальной С.М. Биотехнологические разработки стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: Материалы III Всеросс. науч.-практ. конф. с международным участием (24–25 апр. 2019 г.). — Ставрополь, 2019. — С. 278–279.

9. Николаева Л.Л., Гулякин И.Д., Орлова О.Л. и др. Лиофилизация как способ стабилизации лекарственных препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. — 2017. — Т. 51. — № 4. — С. 54–59.
10. Общая фармакопейная статья «Лиофилизаты»: ОФС.1.4.1.0031.18. — М.: Минздрав России, 2018. — 9 с.
11. Общая фармакопейная статья «Сроки годности лекарственных средств»: ОФС.1.1.0009.15. — М.: Минздрав России, 2015. — 15 с.
12. Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н. и др. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. — 2015. — № 4. — С. 21.
13. Фримель Г. (ред.). Иммунологические методы // Монография. Пер. с нем. А.П. Тарасова. — М.: Медицина, 1987. — 472 с.
14. Hennebique A., Boisset S., Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review // Emerging Microbes & Infections. — 2019. — Vol. 8. — P. 1027–1042. DOI: 10.1080/22221751/2019/1638734.

DEVELOPMENT OF A PROTECTIVE DRYING MEDIUM TO STABILIZE ERYTHROCYTE ANTIGENIC TULAREMIA DIAGNOSTICUM

A.G. KOSHKIDKO, S.A. KURCHEVA, I.V. ZHARNIKOVA, O.L. STARTSEVA

Stavropol Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol

The development of optimal drying media for obtaining diagnosticum of erythrocyte antigenic tularemia dry is described. The solution to this problem was realized through the use of stabilizing protective media with different compositions, followed by freeze drying of the drug and setting up control studies. The results of determining the stability of the lyophilized preparation during storage and transportation in various climatic conditions are presented.

Keywords: tularemia, drying medium, drug stability, indirect hemagglutination reaction, lyophilization.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГРИБНОЙ МИКРОФЛОРЫ ВЕРМИКОМПОСТА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ НАВОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПОСТНЫХ ЧЕРВЕЙ *EISENIA FETIDA*

К.К. БОГУСПАЕВ^{1*}, К.А. МУХАТАЕВА¹, Г.К. КАНАЛБЕК¹, А.И. АКИЛЬБЕКОВА¹,
Д.Г. ФАЛЕЕВ¹, И.Н. ТИТОВ², А.А. НУСУПОВ³

¹ Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан;

² Владимирский государственный университет, Владимир, Россия;

³ Алматинский технологический университет, Алматы, Казахстан

Проведен микробиологический и молекулярно-генетический анализ вермикомпоста, полученного на основе навоза крупного рогатого скота (КРС) с использованием компостных червей *Eisenia fetida*. Микробиологический анализ вермикомпоста показал, что он содержал в себе достаточно стабильное микробное сообщество. Исследования по выделению и молекулярно-генетической идентификации грибковых сообществ выявили, что в вермикомпосте доминируют следующие виды грибов: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Aspergillus flavus* и *Fusarium oxysporum*.

Ключевые слова: вермикомпост, компостные черви *Eisenia fetida*, почвенные грибы, микробиологический анализ, ПЦР-анализ.

Введение

Эпигейные дождевые (компостные) черви вида *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) в природе обитают в свежем подстилочном слое лесной почвы, в навозных и компостных кучах. Этот вид компостных червей обычно используется для утилизации органических отходов вермикомпостированием [4], в экотоксикологии [8, 11], в физиологии [16], а также в качестве модельного организма в иммунологии для понимания защитных механизмов почвенных беспозвоночных от микробных патогенов [5, 6, 16]. В системе вермикомпостирования как дождевые черви, так и микроорганизмы играют важную роль в разложении органического вещества. Хотя использование дождевых червей популярно в системах вермикомпостирования, микроорганизмы также играют важную роль в разложении и преобразовании органического вещества, присутствующего в органосодержащих отходах [12]. Активность, обилие и состав сообществ микроорганизмов в вермикомпостах могут быть тесно связаны с эф-

фективностью процесса вермикомпостирования и качеством конечного продукта — вермикомпоста [15].

Целью настоящего исследования было определить качественный и количественный состав микробиоты вермикомпостов с использованием методов выделения чистых культур, молекулярно-генетических методов для получения информации об общей микробной биомассе, структуре и состава сообщества.

Материалы и методы

Для проведения исследований образцы вермикомпостов на основе подстилочного навоза КРС были получены из ТОО «Агрофирма «Турген» (с. Турген, Алматинская область). Для вермикомпостирования использовались компостные черви *E. fetida* по технологии «самоперемещаемых» вермибуртов [2].

Для определения систематических групп микроорганизмов использовали следующие среды: КАА — для актиномицетов; среда Чапека, рН 4,5–5 и КГА (картофельно-глюкозный агар) — для микромицетов. Разведения проводили по методу Коха и делали посеvy на агаризованных средах в трех повторностях по каждому варианту. Чашки Петри с материалом помещали в термостат при 37 °С. Первичный анализ проводили после 72 часов инкубирования [3].

© 2020 г. Богуспаев К.К., Мухатаева К.А., Каналбек Г.К., Акильбекова А.И., Фалеев Д.Г., Титов И.Н., Нусупов А.А.

* **Автор для переписки:**

Богуспаев Карим Касымович

д.б.н., профессор факультета биологии и биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби

E-mail: kboguspaev@yandex.kz

Для молекулярно-генетической идентификации штаммов использовали грибы родов *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. из лабораторной коллекции (3–7-суточные штаммы грибов), выделенные из вермикомпоста. Мицелий замораживали при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем растирали пестиком в 1,5 мл пробирках Eppendorf. Из полученной биомассы выделяли ДНК с помощью набора для выделения ДНК из растений/грибов «Plant/Fungi DNA Isolation Kit» компании NorgenBiotekCorp. (Ontario, Canada) согласно протоколу производителя. Концентрацию ДНК в образцах определяли с помощью флуориметра Qubit TM 2.0 с использованием набора dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Oregon, USA) по шкале для dsDNA HS. В работе использовались универсальные праймеры ITS-региона грибов: ITS1 (5'-TCCGTTAGGTGAACCTGCGG-3') и (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Реакционная смесь для амплификации состояла из: 12,5 мкл Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1,25 мкл Forward праймер (10 мкМ), 1,25 мкл Reverse праймер (10 мкМ), 1,5 мкл ДНК и 8,5 воды. Общий объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл.

ПЦР проводили на амплификаторе Eppendorf ProS (Hamburg, Germany) при режиме амплификации: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 30 сек; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 1 мин; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 40 сек – всего 30 циклов; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 10 мин. Результаты амплификации просматривали в 1,2%-ном агарозном геле. ПЦР-продукты очищали реагентом Clean Sweep™ PCR Purification reagent (Applide Biosystems, USA).

Реакцию секвенирования проводили с применением Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applide Biosystems, USA) согласно инструкции производителя [Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems США] с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3500 DNA Analyzer (Applide Biosystems, USA). Результаты секвенирования обрабатывали в программе SeqA (Applide Biosystems, USA). Полученные нуклеотидные последовательности ITS-региона ДНК грибов были подвергнуты сравнению с данными базы GeneBank (www.ncbi.nih.gov) с помощью программы BLAST. Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения MEGA6. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя алгоритм Clustal W. Для построения филогенетических деревьев использовали метод «объединения соседей» Neighbor-Joining (NJ) [10].

Результаты

Полученные образцы вермикомпоста по агрохимическим, токсикологическим, ветеринарно-санитарным и гигиеническим показателям соответствовали требованиям Национального стандарта Российской Федерации «Удобрения органические. Вермикомпосты. Технические условия» ГОСТ Р 56004-2014, который действует с 2015 года не только на территории РФ, но и на территории стран ЕАЭС [1].

Микробиологический анализ. Микробиологический анализ вермикомпоста показал, что это – продукт с достаточно стабильным сообществом микроорганизмов. Однако определенных закономерностей в распределении их численности не наблюдали. Исследование по выделению и идентификации грибковых сообществ установило, что доминируют грибы родов *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Aspergillus* (рис. 1).

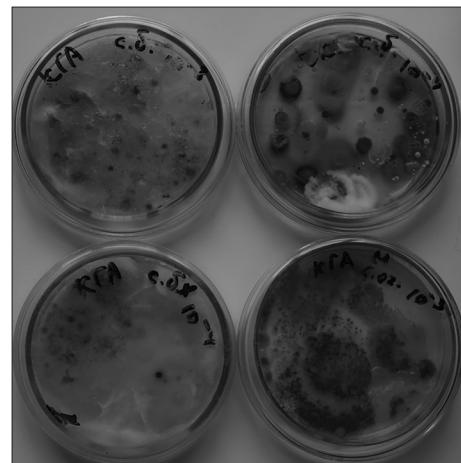


Рис. 1. Рост грибной микрофлоры из сухого вермикомпоста на среде КГА

По культурально-морфологическим признакам были выделены как чистые культуры 2 образца грибов рода *Trichoderma* (рис. 2), а также чистые культуры грибов рода *Aspergillus* и *Fusarium*, которые также являются постоянными обитателями вермикомпоста (рис. 3).

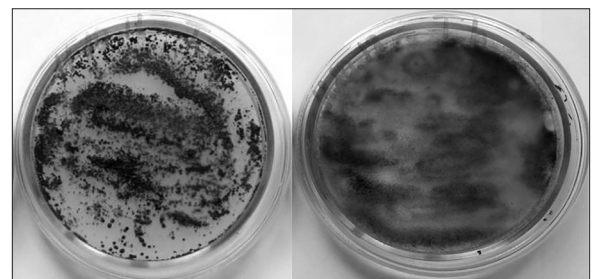


Рис. 2. Чистые культуры грибов рода *Trichoderma*

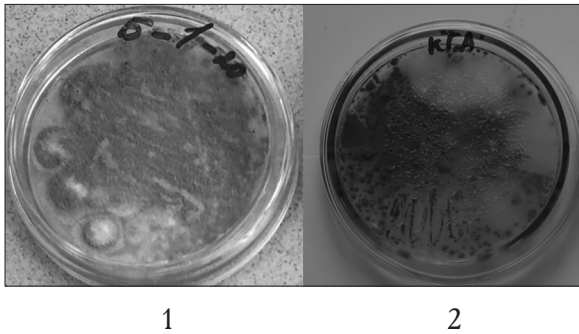


Рис. 3. Культуры грибов рода *Aspergillus* (1) и *Fuzarium* (2)

В дальнейшем для идентификации видового состава грибов было проведено генотипирование образцов, выделенных в чистую культуру.

Идентификация грибов методом секвенирования по Сенгеру. Отбор проб грибов предположительно рода *Trichoderma* для выделения ДНК проводили в соответствии с методикой. Было отобрано 2 образца (*Tr-1*, *Tr-2*), в которых концентрация выделенных препаратов ДНК составляла 25,6 и 72,0 нг/мкл, соответственно.

На следующем этапе в результате амплификации с *ITS*-праймерами были получены ПЦР-продукты размером около 550 бр (рис. 4).

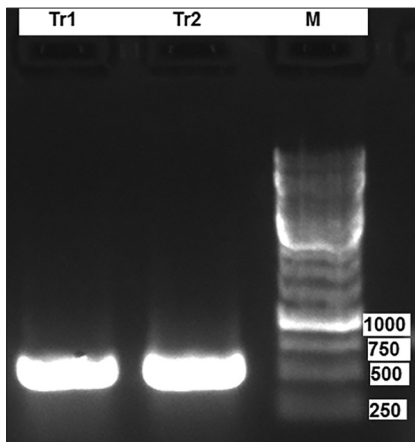


Рис. 4. ПЦР-продукт после амплификации ДНК образцов *Tr-1*, *Tr-2* с *ITS*-праймерами. М – ДНК маркер Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

ПЦР-продукт подвергали очистке с помощью набора ExS-Pure™ Enzymatic PCR Cleanup Kit (Nijmegen The Netherlands) согласно руководству к использованию. Полученный продукт амплифицировали с помощью BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) согласно протоколу производителя. После реакции секвенирования проводили вторую очистку ПЦР-продукта набором для очистки реакций секвенирования BigDye X Terminator Purification Kit и

загружали в генетический анализатор ABI 3500 для проведения капиллярного электрофореза. На рисунке 5 представлена фореграмма образца *Tr-1*.

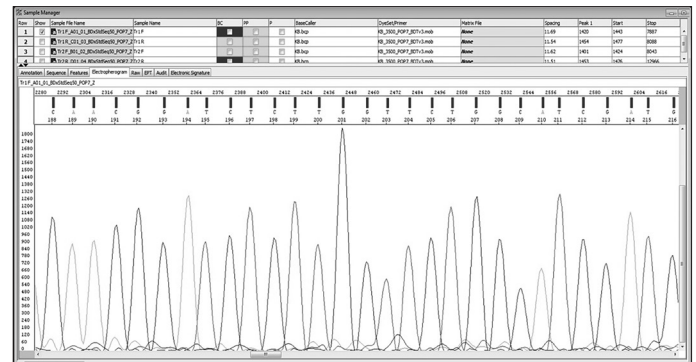


Рис. 5. Фореграмма образца *Tr-1*, полученная на приборе ABI 3500

В результате проведенного анализа была получена нуклеотидная последовательность *ITS*-региона образца грибов *Tr-1* (рис. 6).

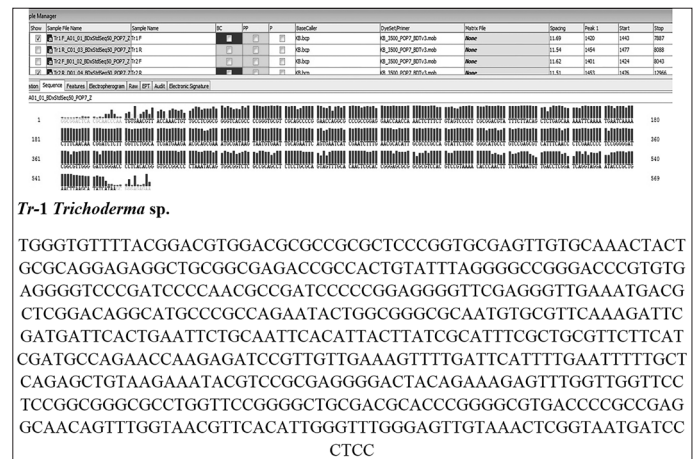


Рис. 6. Нуклеотидная последовательность образца *Tr-1*

Полученные данные были сравнены с данными из Международной базы NCBI. С ближайшими родственными штаммами было построено филогенетическое дерево, позволяющее провести таксономическую идентификацию изучаемых штаммов (рис. 7).

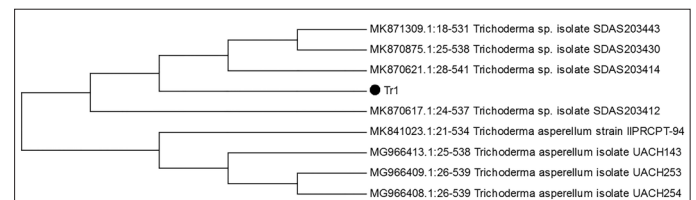


Рис. 7. Филогенетическое дерево образца *Tr-1*

Степень гомологии с ближайшими штаммами составила 99,81%, что позволяет отнести изучаемый штамм как *Trichoderma* sp.

Ниже представлены данные результатов генотипирования образца *Tr-2* (рис. 8–11).

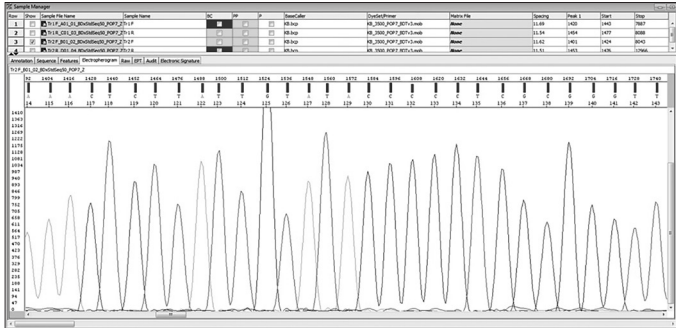


Рис. 8. Фореграмма образца *Tr-2*, полученная на приборе ABI 3500

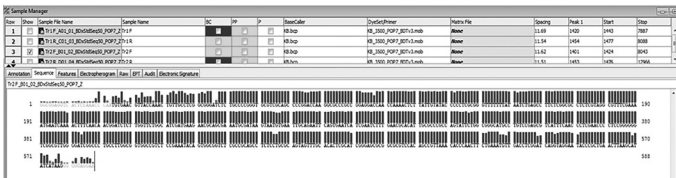


Рис. 9. Последовательность нуклеотидов, полученная при секвенировании образца *Tr-2*

Tr-2 - Trichoderma harzianum
 GAAGTGGGTGTTAAACGGCTGTGGACGCGCCGCTCCCGATGCGAGTGTGCAA
 STACTGCGCAGGAGAGGCTCGGGCGAGACCGCCACTGATTTTCGGAGACGGCCACC
 GCCAAGGACGGGCGATCCCCAACGCCGACCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAA
 TGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAA
 GATTCGATGATCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTCGGTTTC
 TTCATCGATGCCAACAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTCATTCATTTTCGAAA
 CGCTACGAGAGGCGCCGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAACCGCCGAGGGGGTAT
 ACAATAAGAGTTTGGTGGTCCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCA
 CCCGGGCGAGAGATCCCGCCGAGCAACAGTTTGGTAACGTTTCACATTGGGTTTGG
 GAGITGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGAC

Рис. 10. Нуклеотидная последовательность образца *Tr-2*

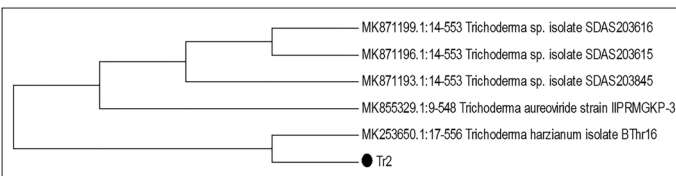


Рис. 11. Филогенетическое дерево образца *Tr-2*

Степень гомологии с ближайшим штаммом MK253650.1:17-556 *Trichoderma harzianum isolate* BThg составила 100%, что позволяет отнести изучаемый штамм к этому виду.

Подобный анализ других образцов штаммов грибов из вермикомпоста показал, что они представлены видами *Aspergillus* sp. (рис. 12–13).

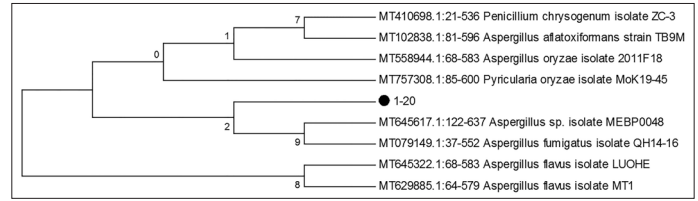


Рис. 12. Степень гомологии со штаммом *Aspergillus* sp. isolate MEBP0048 составила 100%

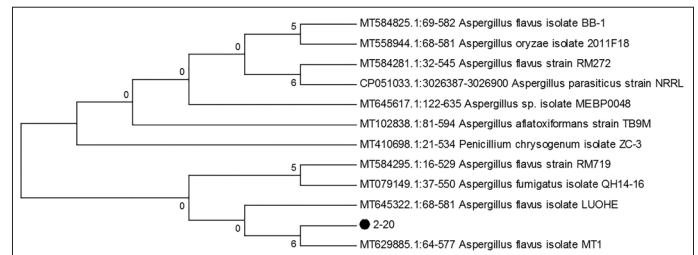


Рис. 13. Степень гомологии со штаммом MT629885.1:64-577 *Aspergillus flavus isolate* MT1 составила 100%

Таким образом, в результате проведенного микробиологического и молекулярно-биологического анализа вермикомпоста, были определены виды грибов, которые постоянно в нем имеются и которые удалось выделить как чистые культуры: *Trichoderma* sp., *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavus* и *Fusarium oxysporum* (рис. 14).

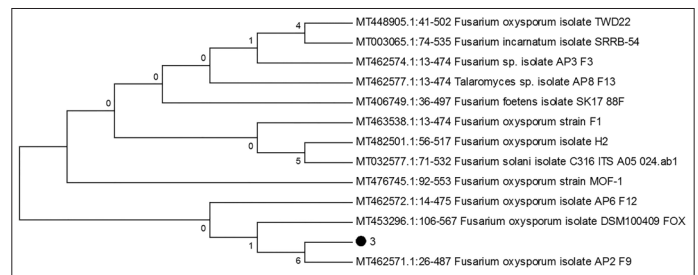


Рис. 14. Степень гомологии со штаммом MT462571.1:26-487 *Fusarium oxysporum isolate* AP2 F9 составила 100%

Обсуждение

Системы вермикомпостирования включают в себя и поддерживают сложную пищевую цепочку, которая приводит к рециклингу органического вещества. Биотические взаимодействия между деструкторами (то есть между бактериями и грибами) и почвенной фауной включают в себя конкуренцию, мутуализм и хищничество. Процесс вермикомпостирования является весьма динамичным, так как предполагает комплексное

взаимодействие дождевых червей с различными видами микроорганизмов [13].

Отношения между дождевыми червями и микроорганизмами разнообразны и сложны. Микроорганизмы — неотъемлемая часть естественного пищевого рациона дождевых червей. Исследования, проведенные в последние годы, выявили стратегии селективного питания различных видов дождевых червей для определенных видов грибов и бактерий [8, 9, 17, 18]. Bonkowski et al. (2000) изучали пищевые предпочтения эпигейного вида дождевого червя *Lumbricus rubellus* по отношению к различным почвенным грибам и показали, что они предпочитали два вида грибов: *Fusarium nivale* и *Cladosporium cladosporioides* [7].

Дождевые черви играют ключевую роль в формировании структуры микробного сообщества в органических отходах в процессе вермикомпостирования. С этой точки зрения и с учетом того, что различные вермикомпосты, производимые различными видами дождевых червей и из различных видов органических отходов, содержат огромное и специфическое разнообразие микроорганизмов, то возможно получить конкретные вермикомпосты для разных практических применений. Это может быть особенно важно при производстве ростовых контейнерных сред и органических удобрений для агробиологии.

Поэтому идеи регуляции состава вермикомпоста путем внесения в вермикомпост дополнительных агентов для его улучшения требуют тщательных всесторонних исследований. Исследования с использованием молекулярных инструментов в настоящее время при изучении процессов вермикомпостирования и вермикомпостов представляют все еще довольно редкое событие [18].

Заключение

Для контроля производства вермикомпоста и получения высококачественных биопрепаратов на его основе необходимо всестороннее, комплексное исследование его микрофлоры и ее влияния на свойства вермикомпоста. Кроме того, изучение структуры микробиологических сообществ может быть использовано для определения степени зрелости вермикомпостов. Можно считать, что дальнейший молекулярный скрининг микробного сообщества вермикомпостов способствует пониманию микробных функций, связанных с компостными червями *E. fetida*.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК AP05135262 «Разработка комплексных биопрепаратов на основе продуцентов биологически актив-

ных компонентов и биотоксинов, обеспечивающих плодородие почв, защиту от патогенов и высокую продуктивность растений».

Литература

- ГОСТ Р 56004-2014. Удобрения органические. Вермикомпосты. Технические условия. Москва. ФГУП «Стандартинформ», 2014. — 10 с.
- Конин С.С., Титов И.Н., Лавров В.В. Способ получения биогумуса. Патент РФ №2255078 от 25.12.2002 г.
- Практикум по микробиологии / Под ред. Нетрусова А.И. — М.: Из-во «Академия», 2005. — 608 с.
- Титов И.Н. Дождевые черви. Руководство в 2-х частях. Часть I: Компостные черви. — М.: ООО «МФК Точка опоры», 2012. — 284 с.
- Bilej M., de Baetselier P., Beschin A. Antimicrobial defense of earthworm // Folia Microbiol. — 2000. — Vol. 45. — P. 283–300.
- Bilej M., de Baetselier P., van Dijck E., Stijlemans B., Colige A., Beschin A. Distinct carbohydrate recognition domains of an invertebrate defense molecule recognize gram-negative and gram-positive bacteria // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 45840–45847.
- Bonkowski M., Griffin B.S., Ritz K. Food preferences of earthworms for soil fungi // Pedobiologia. — 2000. — Vol. 44. — P. 666–676.
- Bouché M.B. Stratégies lombriciennes // In: Persson T. & Lohm U., eds. Soil organism as components of ecosystems / Proceedings of the 6th International soil zoology colloquium, Uppsala, June 1976. — Ecological Bulletins. — 1977. — Vol. 25. — P. 122–132.
- Brown G.G., Barois I. & Lavelle P. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains // Eur. J. Soil Biol. — 2000. — Vol. 36. — P. 177–198.
- Clarridge III J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // Clinical Microbiology Reviews. — 2004. — Vol. 17. — P. 840–862.
- Contreras-Ramos S.M., Alvarez-Bernal D., Dendooven L. Characteristics of earthworms (*Eisenia fetida*) in PAHs contaminated soil amended with sewage sludge or vermicompost // Appl. Soil Ecol. — 2009. — Vol. 41. — P. 269–276.
- Domínguez J. Aira, Gómez-Brandón M. Vermicomposting: Earthworms enhance the work of microbes / In Microbes at Work. — Springer: Berlin, Germany, 2010. — P. 93–114.
- Domínguez J. State of the art and new perspectives on vermicomposting research / In: Edwards CA (ed.) Earthworm ecology, 2nd ed. — CRC, Boca Raton, 2004. — P. 401–424.

14. Hickman Z.A., Reid B.J. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants // Environ. Int. — 2008. — Vol. 34. — P. 1072–1081.
15. Hussain N., Abbasi S. Efficacy of the vermicomposts of different organic wastes as «clean» fertilizers: State-of-the-art // Sustainability. — 2018. — Vol. 10. — Art. 1205.
16. Prochazkova P., Silerov M., Stijlemans B., Dieu M., Halada P., Joskov R., Beschin A., de Baetselier P., Bilej M. Evidence for proteins involved in prophenoloxidase cascade *Eisenia fetida* earthworms // J. Comp. Physiol. — 2006. — B176. — P. 581–587.
17. Römcke J., Jänsch S., Didden W. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts // Ecotoxicological Environ. Saf. — 2005. — Vol. 62 — P. 249–265.
18. Sen B., Chandra T.S. Do earthworms affect dynamics of functional response and genetic structure of microbial community in a lab-scale composting system? // Bioresour. Technol. — 2009. — Vol. 100. — P. 804–811.
19. Torsvik V. & Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems // Curr. Opin. Microbiol. — 2002. — Vol. 5 — P. 240–245.
20. Velando A., Eiroa J., Dominguez J. Brainless but not clueless: earthworms boost their ejaculates when they detect fecund, non-virgin partners // Proc. R. Soc. — 2008. — B275. — P.1067–1072.

MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF FUNGAL MICROFLORA OF THE VERMICOMPOST OBTAINED FROM CATTLE MANURE USING EARTHWORMS *EISENIA FETIDA*

K.K. BOGUSPAEV¹, K.A. MUKHATAYEVA¹, G.K. KANALBEK¹, A.I. AKILBEKOVA¹,
D.G. FALEEV¹, I.N. TITOV², A.A. NUSUPOV³

¹ *al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan;*

² *Vladimir State University, Vladimir, Russia;*

³ *Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan*

Microbiological and molecular genetic analysis of the vermicompost obtained from cattle manure using earthworms *Eisenia fetida* was performed. Microbiological analysis of the vermicompost showed that it contained a fairly stable microbial community. Studies on the isolation and molecular genetic identification of fungal communities have shown that the following types of fungi dominate in vermicompost: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus flavus*, and *Fusarium oxysporum*.

Keywords: vermicompost, earthworms *Eisenia fetida*, soil fungi, microbiological analysis, PCR analysis.

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПИЩЕВЫХ АЗОКРАСИТЕЛЕЙ ЛАКТОБАЦИЛЛАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРИРОДНЫХ И АНТРОПОГЕННЫХ ИСТОЧНИКОВ

П.И. ИВАНОВА^{1,2}, Т.А. ЧЕРДЫНЦЕВА¹, Е.Ю. ХОДЖАЕВ¹, И.А. САВИНОВ^{2,3},
М.А. ГЛАДЧЕНКО¹, Ю.В. ТАКТАРОВА¹, И.Б. КОТОВА^{1*}

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»,

³ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»,
Москва

Проведен скрининг коллекции лактобацилл, выделенных из различных мест обитания, на способность разрушать пищевые азокрасители тартразин и понсо в различных условиях роста. Показано, что штаммы рода *Lactobacillus* с разной скоростью фрагментируют азокрасители на ароматические амины, что выражается в обесцвечивании растворов. Контакт лактобацилл с азокрасителями и интермедиатами их разрушения может приводить к изменению ростовых характеристик штаммов. По итогам скрининга коллекции микроорганизмов определены штаммы лактобацилл, наиболее активно разрушающие азокрасители. И разрешенный как пищевая добавка тартразин, и запрещенный к применению понсо SX не являются веществами, безразличными для культур лактобацилл, и могут подвергаться микробному разложению в желудочно-кишечном тракте с образованием интермедиатов разной токсичности.

Ключевые слова: биодegradация, пищевые азокрасители, лактобациллы.

Введение

Среди экологических проблем современности не последнюю роль играют экологическая безопасность и качество пищевых продуктов. Интенсивное развитие химической промышленности приводит к тому, что в продуктах питания появляются химические вещества, вредные для здоровья человека, в том числе пищевые азокрасители [3, 11]. Синтетические пищевые азокрасители по сравнению с натуральными дают более яркие цвета, хорошо растворимы в воде, легко смешиваются между собой, имеют более длительные сроки хранения [8]. Организм человека постоянно контактирует с такими химическими компонентами и есть данные, что они вызывают заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), печени, сердца и могут приводить к повышению риска развития канцерогенного и мутагенного эффектов [1, 2].

Негативное воздействие азокрасителей и их производных связывают с преобразованием их в реакционно способные интермедиаты, взаимодействующие с молекулами ДНК и гемоглобином крови [17, 21]. Данные токсические вещества также ингибируют выработку человеческого сывороточного альбумина, вызывают хромосомные aberrации, способствуют перекисному окислению липидов, снижают выработку ацетилхолинэстеразы у мышей, увеличивают частоту появления микроядер в клетках человека, повышают количество лимфоцитов и снижают активность уреазы [16, 19]. Поскольку разрешенные пищевые азокрасители регулярно поступают в организм человека с продуктами питания и в составе оболочек лекарственных препаратов, лактобациллы как ключевые представители нормальной (резидентной) микробиоты ЖКТ млекопитающих [14] постоянно контактируют с этими ксенобиотиками. Разные штаммы лактобацилл находят все большее применение в качестве компонентов пробиотических препаратов и заквасок для функциональных продуктов [12], однако влияние пищевых азокрасителей на молочнокислые микроорганизмы изучено недостаточно. Первичным резервуаром этих микроорганизмов считают также наземные части растений [13]. Молочнокислые микроорганизмы постоянно

© 2020 г. Иванова П.И., Чердынцева Т.А., Ходжаев Е.Ю., Савинов И.А., Гладченко М.А., Тактарова Ю.В., Котова И.Б.

* **Автор для переписки:**

Котова Ирина Борисовна

доктор биол. наук, профессор кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

E-mail: kira1959@gmail.com

присутствуют в природных анаэробных сообществах почв и донных отложений водоемов, которые считаются их вторичными резервуарами. Поскольку пока азокрасители активно используются в пищевой и фармацевтической промышленности, то важным является вопрос об их влиянии на штаммы лактобацилл и об их стабильности при контакте с этими молочнокислыми микроорганизмами.

В анаэробных условиях первой стадией разрушения азокрасителей является восстановительный разрыв азосвязи с образованием бесцветных ароматических аминов, которые, с одной стороны, могут быть субстратами для роста культур, а с другой — обладать токсичностью по отношению к лактобациллам [6].

Целью настоящей работы было изучение биодеградации разрешенного пищевого азокрасителя Tartrazine и

запрещенного в большинстве стран Ронсеау SX лактобациллами с пробиотическими свойствами и выявление возможного влияния этих соединений на рост самих лактобацилл.

Материалы и методы

Источники биологического материала. В работе были использованы 12 культур молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (табл. 1), ряд из которых обладал пробиотическими свойствами, такими как высокая степень адгезии и различная степень устойчивости к кишечному (К) и/или желудочному (Ж) стрессам.

Таблица 1

Использованные культуры молочнокислых бактерий

| № | Штамм | Источник выделения | Изученные пробиотические свойства, ссылки |
|----|--|---|---|
| 1 | <i>Lactobacillus plantarum</i> CM MSU 508 | Россия, Московская обл., домашний сыр | Степень устойчивости к Ж — очень хорошая, к К — приемлемая [13, 14] |
| 2 | <i>Lactobacillus paracasei</i> CM MSU 527 | Россия, Московская обл., сметана | Степень устойчивости к Ж и К — очень хорошая [13, 14] |
| 3 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CM MSU 528 | Россия, Москва, кал младенца (возраст 4 мес.) | Степень устойчивости к Ж и К — очень хорошая [13, 14] |
| 4 | <i>Lactobacillus brevis</i> CM MSU 541 | Россия, Московская обл., молочнокислый продукт | Степень устойчивости к Ж — приемлемая, к К — хорошая [13, 14] |
| 5 | <i>Lactobacillus paracasei</i> CM MSU 544 | Россия, Рязань, сметана | Степень устойчивости к Ж и К — очень хорошая [13, 14] |
| 6 | <i>Lactobacillus reuteri</i> CM MSU 570 | Россия, Московская обл., экскременты козы | Удовлетворительная адгезия к эритроцитам и хорошая адгезия на пластик, степень устойчивости к К — неудовлетворительная, к Ж — не изучена [13, 14] |
| 7 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CM MSU 571 | Армения, Ереван, молочнокислый продукт Мацони | Хорошая адгезия к эритроцитам, мушину, БСА, пластику, степень устойчивости к К — приемлемая, к Ж — очень хорошая [13, 14] |
| 8 | <i>Lactobacillus plantarum</i> CM MSU 588 | Россия, Москва, кал новорожденного (возраст 6 дней) | Степень устойчивости к Ж и К — очень хорошая [13, 14] |
| 9 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> №1 V | Биологически активная добавка к пище «Vagilas» | Восстанавливают естественную кислую среду во влагалище (рН=3,8–4,5) и повышают устойчивость слизистой к воздействию патогенных микроорганизмов [22, 23] |
| 10 | <i>Lactobacillus fermentum</i> №2 L | Пробиотический препарат «Лактобактерин» | Высокая антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно патогенным микробам, за счет образования молочной кислоты и перекиси водорода, продуцирования лизоцима и бактериоцинов [7] |
| 11 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L-43.1 | Мезофильный гранулярный ил очистных сооружений стоков пивоваренного завода «Efes Pilsener» (Москва) | Степень устойчивости к Ж и К — неприемлемая [13, 14] |
| 12 | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> L-34 | Донные отложения озера Цайдам (Бурятия) | Степень устойчивости к Ж и К — неприемлемая [13, 14] |

Субстраты. В качестве субстратов были использованы пищевые азокрасители: запрещенный к применению Ronseau SX (понсо, E-125; Aldrich, США) и широко применяемый в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности Tartrazine (тартразин, E-102; Fluka, Мексика). Понсо SX ранее широко использовался как пищевая добавка для придания цвета и его усиления в разных видах продуктов. В настоящее время его использование в этом качестве запрещено в большинстве стран мира. Тартразин — это разрешенная пищевая добавка, которая активно применяется из-за его низкой стоимости и яркого цвета. Его используют в мороженом, желе, овощных и фруктовых пюре, йогуртах, супах, специях желтого цвета (горчице), консервации, газированных напитках, конфетах, тортах, а также в оболочках таблеток и сиропах [15]. Данные красители хранили для экспериментов в виде анаэробных концентрированных растворов в стерильной дистиллированной воде и добавляли в опытные флаконы с помощью стерильных шприцев. В качестве предполагаемых интермедиатов разложения азокрасителей рассматривали сульфаниловую кислоту (Aldrich, США), 1,4-фенилендиамин (Aldrich, США) и 1-амино-2-нафтол (Aldrich, США).

Среды и условия культивирования. Для культивирования лактобацилл использовали среду MRS (Merck, Германия) следующего состава (г/л): гидролизат казеина — 10,0, мясной экстракт — 10,0, дрожжевой экстракт — 5,0, глюкоза — 20,0, ацетат Na — 5,0, цитрат аммония — 2,0, твин 80 — 1,0, K_2HPO_4 — 2,0, $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,2, $MnSO_4 \times 4H_2O$ — 0,05, pH=6,2–6,5. Агаризованную среду MRS получали, добавляя в жидкую MRS 2% (по массе) агара. Среды стерилизовали автоклавированием (0,5 атм).

Штаммы лактобацилл культивировали на чашках в аэробных и анаэробных условиях. В расплавленную стерильную агаризованную среду вносили раствор азокрасителя до конечной концентрации 1,0 мМ, среду разливали в стерильные чашки Петри и после застывания агара рассевали культуры по Коху для получения отдельных колоний. Для анаэробной инкубации применяли анаэробные боксы с использованием пакетов Genbox (bioMerieux, Франция).

Культуры также выращивали в пузырьках объемом 10 мл с герметично закрывающимися резиновыми пробками, зажатыми алюминиевыми колпачками, в жидкой среде MRS в анаэробных условиях. Объем жидкой фазы составлял 9 мл. Для создания анаэробных условий газовая фаза была заменена на инертный газ (аргон). В каждый пузырек после стерилизации добавляли азокраситель из анаэробного концентрированного раствора до конечной концентрации 1,0 мМ и вносили инокулят в количестве 10% от объема среды. Культивирование проводили при 37 °С без перемешивания. Все отборы проб, а также добавление различных субстратов осуществляли с помощью стерильных шприцев, не нарушая условий анаэробнозиса и стерильности.

Все эксперименты проводили в двух повторностях.

Методы анализа. Обесцвечивание азокрасителей на чашках учитывали по разнице радиусов зоны просветления вокруг колонии (если таковую наблюдали) и колонии лактобацилл на агаризованной среде.

Анализ расщепления азосвязи и содержания ароматических соединений в культуральной жидкости проводили путем спектрофотометрического сканирования в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм в фосфатном буфере, предварительно центрифугируя пробу при 15000 г в течение 10 мин., на спектрофотометре Shimadzu UV-1202 (Япония). Концентрацию веществ определяли по величине оптической плотности при длинах волн максимумов поглощения, используя калибровочные кривые для каждого вещества. Оптимумы поглощения, а также некоторые другие свойства приведены в таблице 2. Для анализа отбирали пробы в количестве 1 мл стерильными шприцами.

Масс-спектрометрический анализ ароматических продуктов обесцвечивания азокрасителей проводили с использованием газового хроматографа HP5890-II (Hewlett Packard, США), снабженного TCD-детектором, и масс-спектрометра 5974A MSD (Hewlett Packard, США). Разделение компонентов пробы проводили на капиллярной колонке Sil5CB-MS 25 м × 0,32 мм (Chrompack, Varian Inc., США).

Таблица 2

Некоторые свойства используемых азокрасителей и ароматических аминов

| Характеристика | Азокраситель | | Ароматические амины | | |
|--------------------------------------|--------------|-----------|-----------------------|--------------------|------------------|
| | Понсо SX | Тартразин | Сульфаниловая кислота | 1,4-фенилен-диамин | 1-амино-2-нафтол |
| Молекулярная масса, г/моль | 604,5 | 534,5 | 173 | 108 | 159 |
| Характерные максимумы поглощения, нм | 354, 520 | 428 | 250 | 239, 302 | 290, 330 |
| Индекс пищевой добавки | E125 | E102 | - | - | - |
| Цвет порошка (раствора) | красный | желтый | нет цвета | нет цвета | нет цвета |

Оценку роста культур на жидкой среде осуществляли при помощи нефелометрии при длине волны 540 нм с использованием фотоэлектрического колориметра-нефелометра ФЭКН-57 (Россия). В ряде случаев количество клеток определяли с помощью расщепов на агаризованную MRS по Коху.

Результаты и обсуждение

Чистые культуры лактобацилл были выделены из фекалий, кисломолочных продуктов домашнего изготовления и пробиотических препаратов Вагилак (V) и Лактобактерин (L), а *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L-34 и *Lactobacillus rhamnosus* L-43.1 – из активных, разрушающих аминокислоты метаногенных сообществ, полученных из донного осадка озера Цайдам и анаэробного ила стоков пивоваренного завода «Эфес-Пилснер», соответственно (табл. 1). Все штаммы обладали различными пробиотическими свойствами, однако штаммы *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L-34 и *Lactobacillus rhamnosus* L-43.1 не предполагалось использовать в качестве пробиотиков, поскольку донные осадки и илы сточных вод считаются неблагоприятным источником получения пробиотических культур. Эти культуры в работе взяты для сравнения.

Для проверки возможности использования чашечного экспресс-метода отбора колоний лактобацилл на способность разрушать азокрасители [18] штаммы лактобацилл высевали на агаризованную среду MRS,

содержащую в разных чашках Петри разные азокрасители в концентрации 1 мМ. Поскольку лактобациллы являются аэротолерантными анаэробами, то инкубацию чашек осуществляли как аэробно, так и в анаэробных боксах. Показано, что колонии бактерий сорбируют красители и вокруг них видны зоны просветления в виде кольца шириной около 1 мм или больше (рис. 1, табл. 3). Это говорит о возможном воздействии молочнокислых бактерий на красители (их разрушении, обесцвечивании).

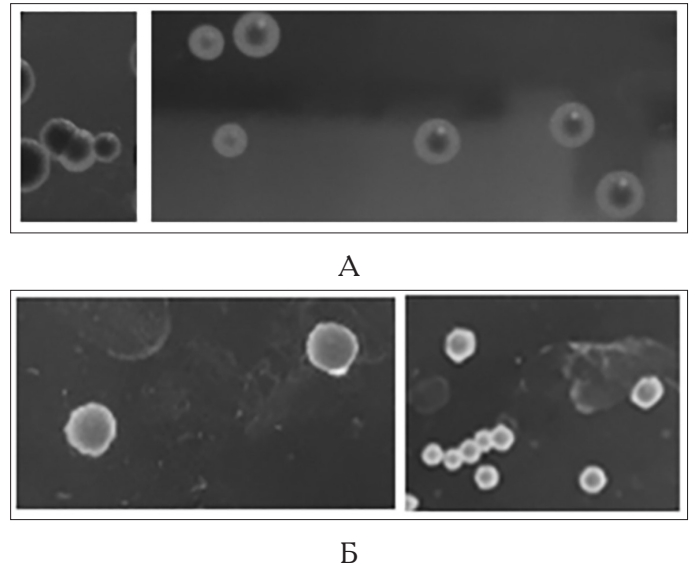


Рис. 1. Зоны просветления вокруг колоний лактобацилл на агаризованной среде с азокрасителем (А – понсо, Б – тартразин)

Таблица 3

Ширина зоны просветления вокруг колоний лактобацилл при росте на плотной питательной среде с азокрасителями (мм)

| | Штамм | Тартразин | Тартразин | Понсо | Понсо |
|----|--|-----------|-----------|---------|-----------|
| | Условия выращивания | аэробно | анаэробно | аэробно | анаэробно |
| 1 | <i>Lactobacillus plantarum</i> CM MSU 508 | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм | ≥ 1 мм |
| 2 | <i>Lactobacillus paracasei</i> CM MSU 527 | < 1 мм | ≥ 1 мм | < 1 мм | ≥ 1 мм |
| 3 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CM MSU 528 | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм |
| 4 | <i>Lactobacillus brevis</i> CM MSU 541 | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм |
| 5 | <i>Lactobacillus paracasei</i> CM MSU 544 | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм |
| 6 | <i>Lactobacillus reuteri</i> CM MSU 570 | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм |
| 7 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CM MSU 571 | < 1 мм | ≥ 1 мм | < 1 мм | < 1 мм |
| 8 | <i>Lactobacillus plantarum</i> CM MSU 588 | < 1 мм | < 1 мм | ≥ 1 мм | < 1 мм |
| 9 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> №1 V | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм |
| 10 | <i>Lactobacillus fermentum</i> №2 L | < 1 мм | ≥ 1 мм | < 1 мм | ≥ 1 мм |
| 11 | <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> L-34 | < 1 мм | ≥ 1 мм | < 1 мм | ≥ 1 мм |
| 12 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L-43.1 | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм | < 1 мм |

Штаммы *L. plantarum* СМ МГУ № 508, *L. paracasei* СМ МГУ № 527, *L. fermentum* № 2 L и *L. paracasei* subsp. *paracasei* L-34 сорбировали понсо и образовывали более обширные зоны просветления (более 1 мм) при анаэробном, а *Lactobacillus plantarum* СМ МГУ № 588 — при аэробном культивировании. У остальных изучаемых культур зоны менее 1 мм наблюдали как при анаэробном, так и при аэробном выращивании. Более широкие зоны просветления (более 1 мм) на среде с тартразином появлялись при анаэробном культивировании у

L. paracasei СМ МГУ № 527, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* СМ МГУ №571, *L. fermentum* № 2 L и *L. paracasei* subsp. *paracasei* L-34. У остальных изучаемых культур зоны менее 1 мм наблюдали как при анаэробном, так и при аэробном культивировании.

Анализ структурной формулы азокрасителя понсо SX позволяет предположить, что при восстановлении азосвязи может образоваться ряд интермедиатов, сходных с сульфаниловой кислотой и производными 1,4-фенилендиамина и 1-амино-2-нафтаола (рис. 2).

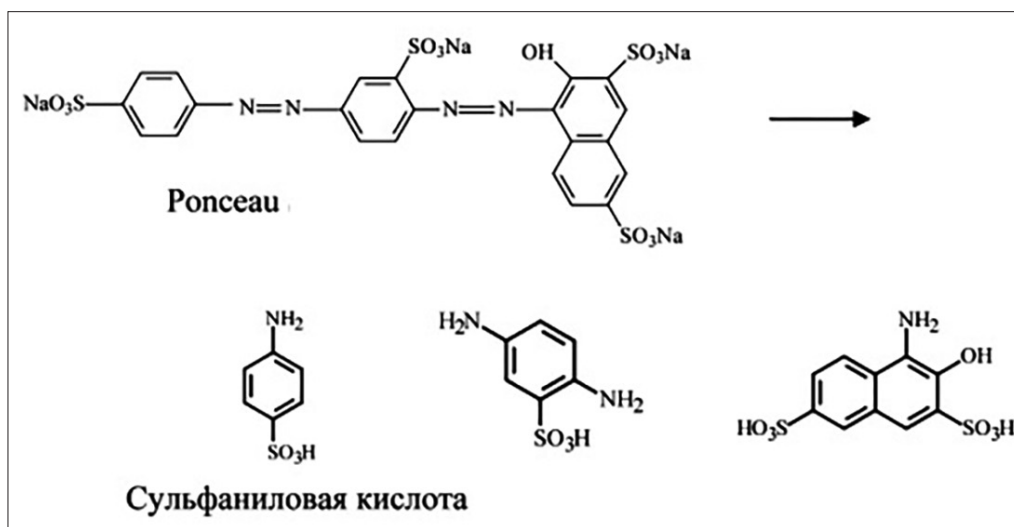


Рис. 2. Предполагаемая схема распада красителя понсо SX при восстановлении азосвязи в анаэробных условиях

При обесцвечивании азокрасителя в культуральной жидкости происходит убыль концентрации субстрата и образование интермедиатов, что приводит к изменению формы спектра. Обращали внимание на основные пики азокрасителя понсо SX (354 и 520 нм)

и появление пиков, соответствующих ароматическим интермедиатам.

Для азокрасителя понсо SX этот процесс можно наблюдать по исчезновению малиновой окраски визуально (рис. 3).

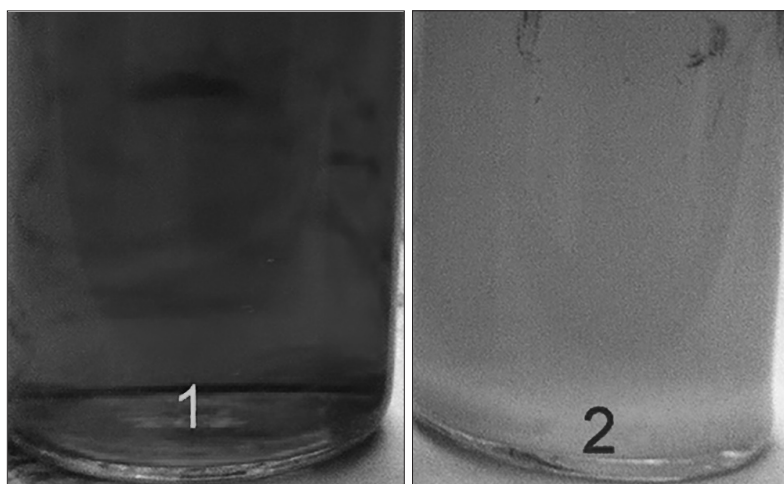


Рис. 3. Обесцвечивание азокрасителя понсо SX на примере *L. paracasei* subsp. *paracasei* L-34 (для других культур, разрушающих понсо, картина аналогичная): 1 — вид культуральной жидкости опытного варианта при росте культуры на среде с понсо в нулевой точке; 2 — вид культуральной жидкости того же варианта на 3 сут. (исчезновение малиновой окраски, среда приобретает свой натуральный желто-коричневый цвет)

Обесцвечивание раствора сопровождается одновременно значительными изменениями формы спектра: максимумы поглощения на 354 и 520 нм, характерные для понсо, полностью исчезают, но появляется четкий пик на 250 нм, соответствующий сульфаниловой кислоте и

регистрирующийся до конца опыта (рис. 4), а также пик неидентифицированного интермедиата (около 380 нм), исчезающий к 92 ч роста. Образование и присутствие в культуральной жидкости сульфаниловой кислоты были подтверждены с помощью масс-спектрометрии.

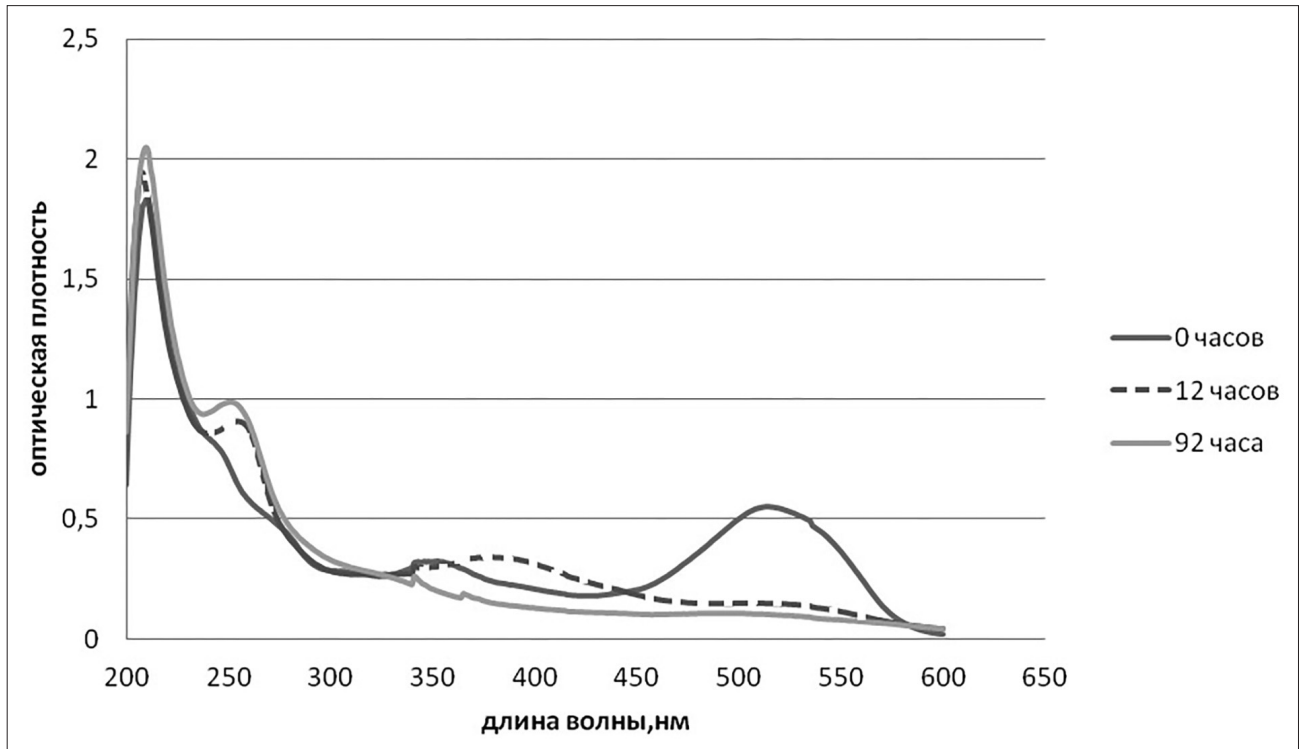


Рис. 4. Изменение формы спектра при инкубации штамма *L. delbrueckii* с понсо (для двух других культур картина аналогичная)

Через 96 ч инкубации процент обесцвечивания (степень конверсии) азокрасителя для разных штаммов составлял от 0 до 92% (табл. 4). Наиболее активными в обесцвечивании понсо были: *Lactobacillus paracasei* CM MSU № 544 (68%), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CM MSU № 571 (81%), *Lactobacillus paracasei*

subsp. *paracasei* L-34 (85%) и *Lactobacillus rhamnosus* L-43.1 (92%).

Химическая структура тартразина позволяет предположить, что при разрыве азосвязи будут образовываться следующие промежуточные соединения (рис. 5):

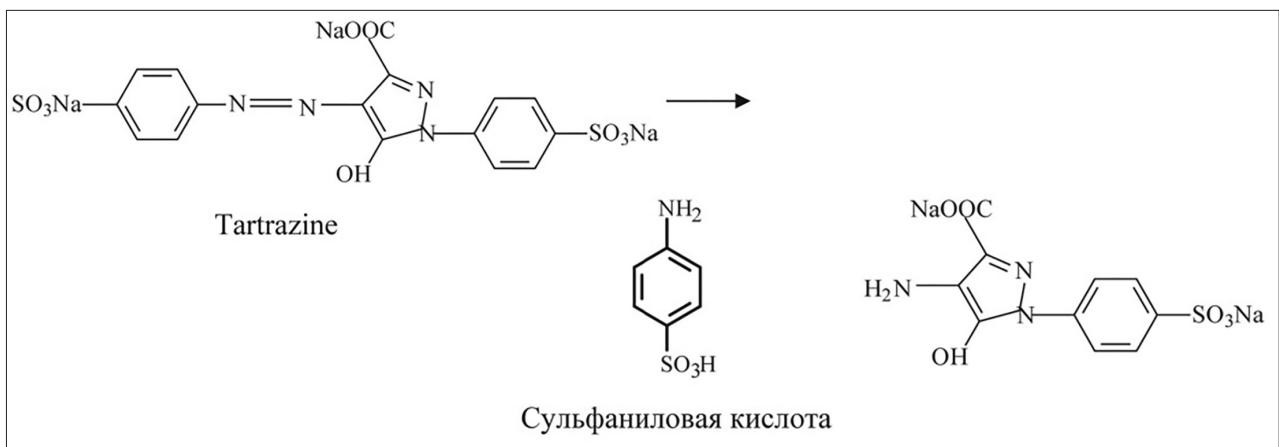


Рис. 5. Предполагаемая схема распада тартразина при восстановлении азосвязи в анаэробных условиях

Так как цвет среды MRS близок к окраске тартразина, то визуальная детекция его обесцвечивания была затруднена. Спектральный анализ показал исчезновение пика на 428 нм (рис. 6) и увеличение пика на 250 нм, что говорит о разрушении азокрасителя с образованием интермедиата, соответствующего сульфаниловой кислоте. Образование и присутствие в культуральной жидкости сульфаниловой кислоты регистрировали также при помощи масс-спектрометрического анализа.

сителя с образованием интермедиата, соответствующего сульфаниловой кислоте. Образование и присутствие в культуральной жидкости сульфаниловой кислоты регистрировали также при помощи масс-спектрометрического анализа.

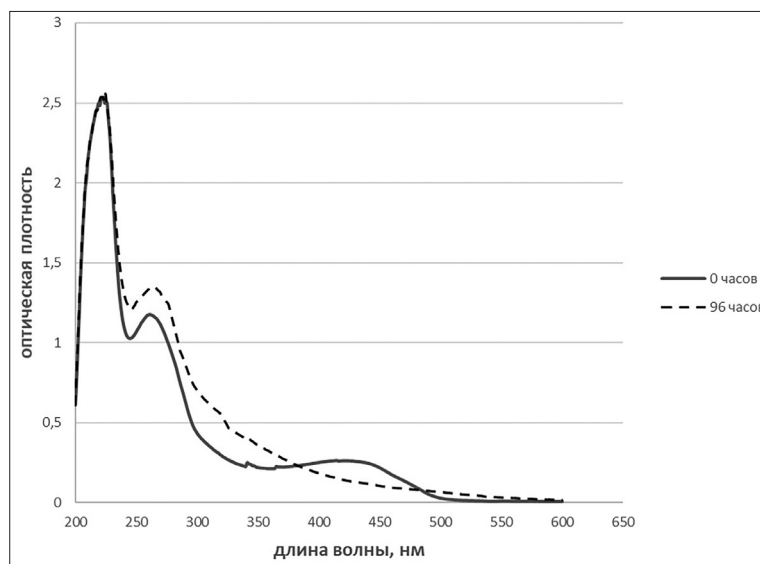


Рис. 6. Изменение спектральных характеристик у образца с тартразином при росте культуры *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CM MSU № 571 на MRS в анаэробных условиях (для других культур картина аналогичная)

Через 96 ч инкубации процент обесцвечивания (степень конверсии) азокрасителя для разных штаммов составлял от 0 до 84% (табл. 4). Наиболее активными в обесцвечивании тартразина

были: *Lactobacillus rhamnosus* L-43.1 (51%), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L-34 (72%) и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CM MSU № 571 (84%).

Таблица 4

Сравнение активности штаммов лактобацилл при росте в анаэробных условиях на жидкой среде MRS с азокрасителями и влияние азокрасителей на рост культур

| Штамм | Азокраситель в среде | % обесцвечивания при росте на жидкой среде MRS в анаэробных условиях на 5-е сутки роста | Влияние азокрасителя на рост культуры |
|--|----------------------|---|---------------------------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> CM MSU № 508 | Понсо | 0 | Ингибирование 100% |
| | Тартразин | 2 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> CM MSU № 527 | Понсо | 0 | Ингибирование 100% |
| | Тартразин | 3 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CM MSU № 528 | Понсо | 36 | Не влияет |
| | Тартразин | 0 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus brevis</i> CM MSU № 541 | Понсо | 0 | Ингибирование 100% |
| | Тартразин | 3 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> CM MSU № 544 | Понсо | 68 | Не влияет |
| | Тартразин | 10 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> CM MSU № 570 | Понсо | 3 | Не влияет |
| | Тартразин | 8 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> CM MSU № 571 | Понсо | 81 | Ингибирование 77% |
| | Тартразин | 84 | Не влияет |

| | | | |
|---|-----------|----|--------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> CM MSU № 588 | Понсо | 0 | Ингибирование 100% |
| | Тартразин | 12 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> № 1 V | Понсо | 6 | Не влияет |
| | Тартразин | 9 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> № 2 L | Понсо | 4 | Не влияет |
| | Тартразин | 0 | Не влияет |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> L-34 | Понсо | 85 | Стимуляция 40% |
| | Тартразин | 72 | Ингибирование 12% |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L-43.1 | Понсо | 92 | Ингибирование 17% |
| | Тартразин | 51 | Ингибирование 40% |

Без добавления азокрасителей все 12 штаммов активно росли в течение 2–3 суток, а затем переходили в стационарную фазу, что сопровождалось постепенным снижением значения рН среды с 6,5 до 4,0.

Результаты исследований показали, что тартразин в использованной концентрации практически не влиял на рост большинства штаммов, ингибирование на 12–40% зафиксировано только для культур, полученных из илов очистного сооружения и озера Цайдам (см. табл. 4).

Влияние понсо на развитие лактобацилл было более разнообразным (см. табл. 4). Так, для 5 штаммов контакт с азокрасителем приводил к ингибированию роста на 77–100%, один штамм испытывал слабое ингибирование роста (17%), у 5 штаммов не наблюдали никакого влияния на рост и один (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L-34) подвергался даже заметному стимулированию (на 40%) роста.

Таким образом, только штаммы лактобацилл *L. paracasei* subsp. *paracasei* L-34 и *L. rhamnosus* L-43.1, выделенные из активных метаногенных сообществ, разрушающих аминокислоты [9, 10], *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CM MSU № 571 и *L. paracasei* CM MSU № 544, выделенные из молочнокислых продуктов [14], показали значительную активность обесцвечивания как понсо, так и тартразина. Все остальные культуры либо были активны по отношению только к одному азокрасителю, либо обесцвечивание и того, и другого субстрата было незначительным (см. табл. 4). При одновременном анализе степени конверсии азокрасителя и его влияния на рост для каждой культуры можно сделать предварительные выводы, что там, где азокраситель не разрушался, а рост ингибировался, причиной ингибирования был именно данный азокраситель. В случае значительной деградирующей активности (60% и более) к ингибированию роста может приводить не только присутствие самого азокрасителя, но и токсический эффект образовавшихся ароматических аминов. Также при сравнении степени деградации запрещенного

к применению и разрешенного пищевых азокрасителей и их влияния на рост культур видно, что запрещенный понсо SX оказывал более существенное воздействие на рост лактобацилл и при этом быстрее разрушался.

Необходимо также отметить, что, несмотря на простоту использования, метод тестирования лактобацилл на чашках с азокрасителями, по нашему мнению, не отражает реальной активности культур и его можно рассматривать лишь как предварительный экспрессный метод, применяемый для скрининга. Результаты такого тестирования необходимо проверять путем постановки серии дополнительных экспериментов при росте лактобацилл на жидких питательных средах.

Заключение

Показанная нами возможность деструкции пищевых азокрасителей лактобациллами подтверждает, что эти вещества не являются безразличными для организма животных и человека, так как под действием резидентных штаммов лактобацилл они могут претерпевать химические превращения с образованием интермедиатов различной токсичности, а также сами влиять на рост представителей микробиоты ЖКТ. Несмотря на то, что изученные нами лактобациллы и условия их роста в опыте можно рассматривать как модельные, не вполне отвечающие ситуации в ЖКТ млекопитающих, тем не менее время прохождения первой стадии процесса разложения азокрасителя (разрыв азосвязи и образование бесцветных аминов [20]) соответствует длительности нахождения этих субстратов в кишечнике животных и человека (от 12 ч до нескольких суток). Наши результаты показали, что способность к обесцвечиванию красителей является видоспецифичной (и возможно даже штаммоспецифичной), что приводит к появлению различий в активности разных культур в отношении пищевых азокрасителей.

По степени воздействия в соответствии с ГОСТ 12.1.007 [4] и ГОСТ Р 55579-2013 [5] азокрасители от-

носятся к третьему классу опасности (умеренно опасные вещества), для которых средняя смертельная доза при введении в желудок составляет 151–5000 мг/кг. Однако наши исследования установили, что и в значительно меньшей концентрации они могут влиять на ростовые характеристики микроорганизмов и подвергаться микробной конверсии с образованием различных ароматических аминов. При контакте резидентных штаммов лактобацилл, а также штаммов из функциональных продуктов и пробиотических препаратов с пищевыми азокрасителями даже в низких концентрациях могут образовываться токсичные для микробиоты интермедиаты, а также изменяться количество молочнокислых микроорганизмов, что приведет к дисбиозу, и это необходимо учитывать при употреблении продуктов и напитков, содержащих такие вещества.

Литература

1. Бессонов В.В. Пищевые красители. Их безопасность, источники получения и пути поступления в пищевые продукты для детей // Вопросы детской диетологии. — 2010. — Т. 8. — № 4. — С. 37–49.
2. Бессонов В.В. Система контроля использования красителей в производстве пищевой продукции в Российской Федерации. Порядок выбора объектов исследования // Вопросы питания. — 2010. — Т. 79. — № 1. — С. 59–66.
3. Булдаков А.С. Пищевые добавки. Справочник. — М.: «ДеЛи Принт», 2001. — 435 с.
4. ГОСТ 12.1.007. Межгосударственный стандарт «Вредные вещества». Введен 01.01.1977.
5. ГОСТ Р 55579-2013. Национальный стандарт Российской Федерации «Добавки пищевые. Азокрасители». Введен 01.01.2015.
6. Емашова Н.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И., Калужный С.В. Особенности разложения азокрасителей анаэробными микробными сообществами // Прикл. биохим. и микробиол. — 2009. — Т. 45. — № 2. — С. 195–201.
7. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Лактобактерин. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Регистрационный номер ЛС-002098, производство Микроген.
8. Красникова Е.В., Рудометова Н.В. Современные методы контроля синтетических красителей // Пищевые ингредиенты: сырье и добавки: научно-теоретический и производственный журнал. — 2007. — № 1. — С. 31–35.
9. Линькова Ю.В., Дьяконова А.Т., Гладченко М.А., Калужный С.В., Котова И.Б., Стамс А., Нетрусов А.И. Метаногенная деструкция (амино)ароматических веществ анаэробными микробными сообществами // Прикладная биохимия и микробиология. — 2011. — Т. 47. — № 5. — С. 558–565.
10. Линькова Ю.В., Котова И.Б., Нетрусов А.И. Способность микробных сообществ из донных отложений оз. Цайдам к метаногенной деструкции аминоксенобиотиков // Вода: химия и экология. — 2013. — № 1. — С. 64–70.
11. Мартынюк И.А. Современная проблема обеспечения потребительского рынка экологически безопасной пищевой продукцией в РФ // Доклады ТСХА. — 2001. — Вып. 273. — Ч. 2. — С. 362–366.
12. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: теория и практика в 2 ч. Часть 2: учебник для вузов. — М: Издательство Юрайт, 2017. — С. 175–182.
13. Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Пиксасова О.В., Пименова М.А., Мельников В.Г., Хлебников В.С., Абрамов В.М., Нетрусов А.И. Новые штаммы лактобацилл, выделенные из природных источников, как потенциальные пробиотики // «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». Материалы VII Международной конференции (Минск, 31 мая — 4 июня 2010 г.). — Минск: «Белорусская наука», 2010. — С. 76–77.
14. Cherdyntseva T.A., Kotova I.B., Netrusov A.I. The isolation, identification and analyses of lactobacillus genus bacteria with probiotic potential // Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health. — 2015. — Vol.1. — P. 103–113.
15. <https://prodobavki.com/>.
16. Jadhav I., Vasniwal R., Shrivastava D., Jadhav K. Microorganism-based treatment of Azo dyes // J. Environ. Sci. Technol. — 2016. — Vol. 9. — P. 188–197.
17. Pinheiro H.M., Touraud E., Thomas O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters // Dyes and Pigments. — 2004. — Vol. 61. — No. 2. — P. 121–139.
18. Rafi F., Franklin W., Cerniglia C.E. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora // Appl. Environ. Microbiol. — 1990. — Vol. 56. — No. 7. — P. 2146–2151.
19. Ren Sh., Schultz T.W. Identifying the mechanism of aquatic toxicity of selected compounds by hydrophobicity and electrophilicity descriptors // Toxicol. Lett. — 2002. — Vol. 129. — P. 151–160.
20. Solis M., Solis A., Perez H.I., Manjarrez N., Flores M. Microbial decolouration of azo dyes: A review // Proc. Biochem. — 2012. — Vol. 47. — No. 12. — P. 1723–1748.
21. Weisburger J.H. A perspective on the history and significance of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human health // Mutat. Res. — 1997. — Vol. 376. — P. 261–266.
22. www.egis.ru.
23. www.vagilac.ru.

BIODEGRADATION OF FOOD AZO DYES BY LACTOBACILLI ISOLATED FROM VARIOUS NATURAL AND ANTHROPOGENIC SOURCES

P.I. IVANOVA^{1,2}, T.A. CHERDYNTSEVA¹, E. Yu. KHODJAEV¹, I.A. SAVINOV^{2,3},
M.A. GLADCHENKO¹, Yu.V. TAKTAROVA¹, I.B. KOTOVA¹

¹ *Lomonosov Moscow State University,*

² *Moscow State University of Food Production,*

³ *Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy*

A collection of lactobacilli isolated from different habitats was screened for their ability to degrade food azo dyes tartrazine and ponceau under various growth conditions. It was shown that strains of the genus *Lactobacillus* fragment azo dyes into aromatic amines at different rates, and it is signified in the discoloration of solutions. Contact of lactobacilli with azo dyes and intermediates of their degradation can lead to a changes in the growth characteristics of strains. Based on the results of screening a collection of microorganisms, the strains of lactobacilli that most actively destroy azo dyes were identified. Both tartrazine, approved as a food additive, and ponceau SX, prohibited for use, are not substances that are indifferent to lactobacilli cultures, and can undergo microbial degradation in the gastrointestinal tract with the formation of intermediates with various toxicities.

Keywords: biodegradation, food azo dyes, lactobacilli.

СОВМЕСТНАЯ ДОСТАВКА ГИДРОФОБНЫХ И ГИДРОФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ ГИБРИДНЫХ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ

О.Ю. КОЧЕТКОВА*, О.Ю. АНТОНОВА

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино

Представлена успешная стратегия совместного инкапсулирования гидрофобных и гидрофильных соединений в один микроконтейнер. Путем модификации методики послойной сборки противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхности карбонатной частицы и гелеобразования были получены гибридные микрокапсулы. Показана эффективная одновременная загрузка гидрофильных и гидрофобных соединений в гПЭМК. Все исследуемые варианты дизайна гПЭМК показали высокую эффективность загрузки лактоферрина в полость носителя ($82,34 \pm 0,1 - 90,1 \pm 1,2$). Полученные микроконтейнеры также характеризовались значительной загрузкой красного нила в гидрофобный слой. Максимальное количество включалось в микрокапсулы с дизайном OLL (ПА_р/ДС)₂. Независимо от состава и толщины полиэлектролитной оболочки полученные микрокапсулы демонстрировали высокую стабильность при хранении. Исследования влияния со-инкапсулированных ибупрофена и лактоферрина в гПЭМК на ЛПС-стимулируемую продукцию активных форм кислорода, активных форм азота и фактора некроза опухоли-альфа показало существенное протективное действие. Преимущества двойной системы совместной доставки лекарственных соединений заключаются в ее взаимодополняемости и способности регулировать относительную дозировку обоих лекарств в одном интегрированном носителе.

Ключевые слова: микрокапсулы, гидрофильные и гидрофобные соединения, доставка лекарств, ибупрофен, лактоферрин.

Введение

Воспаление является ответом иммунной системы на инфекции, вызванные патогенами, травмами, радиоактивным облучением, воздействием повышенной или пониженной температуры или аутоиммунными процессами. Воспалительный процесс благоприятен и необходим для организма, но только в тех случаях, когда происходит в короткий промежуток времени и под полным контролем иммунной системы — так называемое острое воспаление. Воспаление, сохраняющееся в течение длительного времени, известно как хроническое воспаление и может быть индуцировано различными факторами, а именно: бактериальными, вирусными и паразитарными инфекциями; химическими факторами и многими другими. Активаторами воспаления, инициируемого бактериальным заражением, чаще всего являются эндотоксины — компоненты бактериальной стенки грамм-отрицательных бактерий.

Первая линия защиты организма от патогенов реализуется фагоцитами, а, в частности, нейтрофилами и макрофагами, которые фагоцитируют чужеродные агенты, генерируют активные формы кислорода и азота и высвобождают провоспалительные медиаторы (ФНО- α). В конце своей жизни нейтрофилы подвергаются апоптозу, фагоцитируются и способствуют разрешению воспаления [1]. Однако взаимодействие нейтрофилов с ЛПС приводит к ингибированию апоптоза и интенсивной продукции АФК и АФА, которые вызывают окислительное повреждение (стресс) клеток мозга, сердца, артерий и других тканей и органов, приводя к различным воспалительным хроническим заболеваниям [7]. Показано, что течение ряда тяжелых заболеваний, таких как атеросклероз, иммунопатологии, нейродегенеративные и онкологические заболевания, сопровождается развитием воспалительных процессов. В связи с этим актуальность исследований, направленных на поиск и разработку эффективных подходов для комплексной противовоспалительной и иммуномодулирующей терапии, не вызывает сомнений.

Одновременная доставка различных соединений с разными физико-химическими свойствами к одним целевым клеткам/тканям называется системой совместной доставки. Совместная доставка имеет потенциальные

© 2020 г. Кочеткова О.Ю., Антонова О.Ю.

* **Автор для переписки:**

Кочеткова Ольга Юрьевна

магистр биологии, младший научный сотрудник ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

E-mail: The-kocha@rambler.ru

преимущества, такие как подавление множественной лекарственной резистентности, синергетический эффект и возможность регуляции дозировки с целью снижения побочных эффектов. Использование в качестве контейнеров для совместной доставки гидрофильных и гидрофобных соединений полиэлектролитных микрокапсул представляет большой интерес, поскольку позволяет задействовать все части носителя. Так, гидрофильные соединения (например, белки) могут быть включены в полость носителя, в то время как гидрофобные молекулы — в их многослойные оболочки [2].

Для получения ПЭМК используется широкий спектр полимеров, однако не всегда синтезируемые носители характеризуются высокой эффективностью загрузки и оправданным временем деградации *in vivo*. Поэтому разработки микроконтейнеров для совместной доставки соединений различной природы с оптимальными характеристиками не прекращаются до сих пор.

В настоящей работе нами предложено использование комбинированных природно-синтетических композитов для получения гибридных микрокапсул, в которых в качестве носителя для гидрофобного соединения были использованы сополимеры хитозана желатина и полимолочной кислоты и для сравнения низкомолекулярные олиголактоиды. В качестве эталонного полимера для формирования гидрофобного слоя был использован широко применяемый PLGA. В качестве целевых соединений для инкапсулирования в полость носителя был использован лактоферрин, для гидрофобного слоя — ибупрофен.

Ибупрофен — это нестероидный противовоспалительный препарат, который также обладает жаропонижающими и обезболивающими свойствами. Из-за гидрофобной природы, которая часто ограничивает его применение, микрокапсулирование как эффективный способ повышения его биодоступности и поддержания терапевтического уровня в крови без передозировки [9].

Помимо ИБФ, большой интерес для комбинированной доставки представляет использование в качестве противовоспалительных препаратов иммуномодулирующие белки, среди которых можно отметить железосвязывающий белок лактоферрин и его участие в подавлении развития провоспалительной реакции [6].

В представленной работе были исследованы эффективность загрузки и выход выбранных соединений в зависимости от дизайна полученных микрокапсул. Показано протективное действие со-инкапсулированных ЛФ и ИБФ, направленное на снижение окислительного стресса и синтеза провоспалительного цитокина ФНО-

альфа фагоцитами в модели ЛПС-индуцированного воспаления.

Материалы и методы

Реактивы

Поли(DL-лактид-ко-гликоид) 50:50, (Мв 45 кДа, Boehringer); хитозан/желатин/поли-L-лактид, олиго-(L)-лактид (Мв 5 кДа), олиго-(D)-лактид (Мв 5 кДа) были получены из Института синтетических полимерных материалов РАН (Россия); декстрансульфат натрия (Мв~9–15 кДа), поли-L-аргинин гидрохлорид (Мв~15–70 кДа), поливиниловый спирт (Мв 70 кДа), флуоресцеин-изотиоцианат, ибупрофен, красный нил, ЭДТА, зимозан, форбол-12-миристан-13-ацетат, актиномицин D, нитросиний тетразолий (Sigma, США); фосфатно-солевой буфер, DMEM/F12, RPMI 1640, трипсин, пенициллин, стрептомицин, раствор Хенкса (ПанЭко, Россия); эмбриональная телячья сыворотка (Invitrogen, США); хлороформ (Химмед, Россия); реактив Грисса А и Б, ДМСО (Panreac, Испания).

Синтез и получение гПЭМК

CaCO₃ микрочастицы были получены согласно методике [12]. Для получения гибридных ПЭМК адаптировалась методика [8]. В качестве модельного гидрофобного соединения был использован КН растворенный в ДМСО. PLGA, OLL и OLD также растворялись в ДМСО. Для растворения CGP использовался хлороформ. К 1 мл 1%-ного раствора PLGA (OLL, OLD) в DMSO (или CGP в хлороформе) добавляли 1 мл КН (70 мг/мл на 10 мг микрочастиц CaCO₃). К полученному раствору добавляли 10 мг микрочастиц CaCO₃ (или составные сферолиты с ЛФ-ФИТЦ) и инкубировали при перемешивании в течение одного часа. Затем осадок отделяли центрифугированием при 4000×g в течение 1 минуты и однократно промывали ДМСО или в случае CGP — хлороформом. Полученные ядра смешивали с 1 мл 0,2%-ного водного раствора поливинилового спирта и инкубировали при перемешивании в течение 3–4 мин. Микрочастицы CaCO₃, покрытые гидрофобным слоем, содержащим КН, отделялись центрифугированием при 4000×g в течение 1 минуты и затем промывались водой. Процесс центрифугирования и промывки водой проводился дважды. Полученные микрочастицы использовались для последующего покрытия биodeградируемыми полимерами (ПАр/ДС) методом LbL. Далее карбонатная основа микрочастиц была удалена инкубированием в 0,2 М ЭДТА pH 7,2 в течение 40 мин с последующей промывкой водой дважды. Полученные гПЭМК отде-

ляли от супернатанта центрифугированием при $6000 \times g$ в течение 5 минут. Полученный осадок разводили в необходимом количестве дистиллированной воды или ФосСБ.

Загрузка ЛФ-ФИТЦ и КН в гибридные микрокапсулы

Эффективность инкапсулирования была определена по содержанию модельного соединения (МС) в супернатанте после получения гПЭМК. Количество инкапсулированного соединения ($Q_{MC_{enc}}$) было рассчитано как:

$$Q_{MC_{enc}} = \frac{Q_{MC_1} - Q_{MC_s}}{Q_{MC_1}},$$

Эффективность инкапсулирования (E_{enc} , %) была определена как:

$$E_{enc} = \frac{Q_{MC_1} - Q_{MC_s}}{Q_{MC_1}} \times 100\%,$$

где Q_{MC_1} — начальное количество МС, используемое для инкапсулирования, Q_{MC_s} — количество МС в супернатанте после получения гПЭМК. Количество МС в образцах было определено по интенсивности флуоресценции на приборе Infinite F200 (Tecan, Швейцария).

Выход инкапсулированных соединений из гибридных микрокапсул

Для исследования высвобождения МС из гПЭМК образцы помещались в 2 мл ФосСБ pH 7,2 при $37^\circ C$ в условиях постоянного перемешивания. После заданных промежутков времени образцы центрифугировались и супернатант заменяли на свежий ФосСБ. Количество ЛФ-ФИТЦ и КН определяли по интенсивности флуоресценции, используя Infinite F200 (Tecan, Швейцария).

Суммарный выход (Rel , %) рассчитывался по уравнению:

$$Rel = \frac{Q_{MC_{enc}} - Q_{MC_t}}{Q_{MC_{enc}}} \times 100\%,$$

где Q_{MC_t} — количество МС в супернатанте в заданные промежутки времени.

Выделение нейтрофилов из крови человека

Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых доноров-добровольцев с помощью метода дифференциального центрифугирования на 2-слойном градиенте фикола-верографина (1,119 г/мл и 1,077 г/мл) согласно методике, описанной в [4].

Выделение перитонеальных макрофагов крыс

В работе использовали крыс-самцов породы Wistar массой 200–250 г. Для получения перитонеальных макрофагов крысам вводили внутривентрально 50 мг/кг

раствора зимозана. Через 24 часа животное умерщвляли декапитацией. Выделение макрофагов проводили методом «перитонеального лаважа» [11]. Далее полученную суспензию клеток центрифугировали при 300 g в течение 4 минут, осадок ресуспендировали в среде DMEM/F-12 с добавлением 10% ЭТС.

Определение продукции АФА перитонеальными макрофагами

Перитонеальные макрофаги крысы помещали в 24-луночные планшеты 1×10^6 клеток на лунку в 1 мл раствора Хенкса и инкубировали в течение 1 ч. После этого раствор Хенкса заменяли культуральной средой RPMI 1640, содержащей 5% ЭТС, и затем добавляли ЛФ (20 мкг/мл), ИБФ (5 мкг/мл) или гПЭМК, содержащие целевые соединения. Клетки инкубировали в течение 16 часов при $37^\circ C$ и 5% CO_2 . После 16-часовой инкубации добавляли ЛПС, клетки инкубировали в течение 1 часа при $37^\circ C$. Далее собирали супернатант и центрифугировали 2 мин при 2000 об./мин для осаждения неприкрепившихся клеток. В 96 планшет добавляли 1:1 супернатант и реактив Грисса. Инкубировали в течение 10 мин и определяли оптическую плотность при 540 нм с использованием считывающего устройства Uniplanplate.

Определение продукции АФК нейтрофилами

Уровень АФК в нейтрофилах определяли с помощью нитросинего тетразолия (NBT). Клетки помещали в 24-луночные планшеты (Sarstedt, Германия) с повышенной адгезией 1×10^6 клеток на лунку в 1 мл раствора Хенкса и инкубировали в течение 2 ч. После этого раствор Хенкса заменяли культуральной средой, содержащей 5% ЭТС, и затем добавляли ЛФ (20 мкг/мл), ИВУ (5 мкг/мл) или капсулы, содержащие целевые соединения. Клетки инкубировали в течение 16 часов при $37^\circ C$ и 5% CO_2 . После 16-часовой инкубации добавляли ЛПС, клетки инкубировали в течение 30 мин при $37^\circ C$. Далее культуральную среду заменяли на 0,1%-ный раствор NBT и инкубировали в течение 30 мин при $37^\circ C$. Клетки дважды промывали ФосСБ и высушивали в термостате при $37^\circ C$. Образовавшийся внутриклеточный формазан растворяли в 120 мкл 2 М КОН и 140 мкл ДМСО. Оптическую плотность определяли при 620 нм с использованием считывающего устройства Uniplanplate.

Определение продукции ФНО- α макрофагами

Клеточная культура промоноцитарных клеток человека THP-1 получена из Американской Коллекции Клеточных Культур — АТСС, каталожный номер TIB202 (Sigma, США). Для дифференцировки клетки THP1 рассеивали по 10^6 кл. на лунку в 24-луночный планшет в 2 мл культуральной среды, добавляли 200

нмоль ФМА и культивировали в течение 72 ч при 37 °С и 5% CO₂. Заменяли культуральную среду на свежую и использовали клетки для работы.

Продукцию ФНО- α оценивали на основании цитотоксического эффекта супернатантов ТНР-1 с использованием клеток L-929 в качестве мишени. Клетки L-929 были получены из Российской коллекции тканевых культур Института цитологии РАН. Клетки L-929 (2×10⁴ клеток/100 мкл) помещали в 96-луночные планшеты с плоским дном и культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% инактивированной сывороткой ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °С и 5% CO₂ в течение 24 часов. Через 24 часа к монослою добавляли актиномицин D (1 мкг/мл), а также 100 мкл супернатанта клеток ТНР-1 на лунку. В контрольные лунки добавляли чистую среду. Планшеты инкубировали в течение 24 ч и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Выживаемость клеток определяли после полного растворения кристаллов в 1% SDS. Поглощение при 595 нм определяли с использованием планшетного ридера Uniplan. Относительные уровни продукции ФНО- α были определены на основе индекса токсичности [10].

Статистический анализ данных

Результаты были представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Статистический анализ проводился с использованием критерия Стьюдента. При значении $p < 0,05$ результаты считались статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Исследование эффективности инкапсулирования лактоферрина и красного нила в гПЭМК

Биодеградируемые гибридные микрокапсулы были получены в результате модификации методов гелеобразования *in situ* и методики LbL. В качестве биодеградируемых полиэлектролитов были использованы: декстрана сульфат, поли-L-аргинин; в качестве носителя для модельного гидрофобного соединения (КН): PLGA, CGP, OLL и OLD.

Исследование эффективности загрузки ЛФ в полость микрокапсул и КН в гидрофобный слой показало (табл. 1), что максимальное количество КН (60%) включалось в гПЭМК, имеющие в составе OLL. При использовании PLGA, CGP и OLD процент включения составлял до 40%. Независимо от состава полиэлектролитной оболочки, гибридные микрокапсулы демонстрировали высокую стабильность при хранении при 37 °С

(табл. 2). Пористая структура и толщина полимерной оболочки определяют скорость высвобождения инкапсулированных соединений. Полученные нами результаты позволяют предположить, что наличие гидрофобного слоя затрудняет свободную диффузию инкапсулированного в полость ЛФ и обеспечивает пролонгированный выход, что является преимуществом при адресной доставке лекарственных соединений.

Таблица 1

Эффективность загрузки в гПЭМК лактоферрина и красного нила

| Дизайн гПЭМК | Эффективность включения ЛФ-ФИТЦ в полость гПЭМК, % | Эффективность включения КН в гидрофобный слой, % |
|---|--|--|
| PLGA (ПА _p /ДС) ₂ | 82,34±0,10 | 20,91±2,02 |
| CGP (ПА _p /ДС) ₂ | 90,10±1,20 | 40,10±1,90 |
| OLL (ПА _p /ДС) ₂ | 89,03±4,00 | 60,42±3,67 |
| OLD (ПА _p /ДС) ₂ | 83,22±2,30 | 18,12±1,33 |

Таблица 2

Профили высвобождения лактоферрина и красного нила из гПЭМК

| Дизайн гПЭМК | Суммарный ЛФ-ФИТЦ, % | Суммарный выход КН, % |
|---|--------------------------|--------------------------|
| | 37 °С (114 ч – 3 экс) | 37 °С (114 ч – 3 экс) |
| PLGA (ПА _p /ДС) ₂ | 0,23±0,01 | 0,016±0,010 |
| CGP (ПА _p /ДС) ₂ | 0,41±0,10 | 0,003±0,001 |
| OLL (ПА _p /ДС) ₂ | 0,09±0,03 | 0,009±0,003 |
| OLD (ПА _p /ДС) ₂ | 0,37±0,18 | 0,0002±0,0001 |

Исследование влияния инкапсулированных ибупрофена и лактоферрина на окислительный стресс у фагоцитов

Было проведено исследование влияния инкапсулированных ИБФ и ЛФ на ЛПС-индуцированный окислительный стресс фагоцитов млекопитающих. ИБФ и ЛФ включали в микрокапсулы, имеющие структуру OLL (ПА_p/ДС)₂. Ранее нами было показано, что в данный тип капсул можно инкапсулировать максимальное количество целевых соединений.

Исследование влияния гПЭМК на ЛПС-индуцированную продукцию АФК нейтрофилами

Условия воспаления моделировались праймированием фагоцитов ЛПС. Одной из стадий клеточного ответа на ЛПС является активация НАДФН оксидазы и генерация АФК. Полученные результаты продемонстри-

ровали (рис. 1), что 16-часовая инкубация нейтрофилов человека с гПЭМК с инкапсулированными соединениями в присутствии ЛПС приводила к значительному снижению генерации АФК нейтрофилами (с $645,23 \pm 25,23\%$ для ЛПС до $356,85 \pm 18,12\%$ для инкубации ЛФ+ИБФ в присутствии ЛПС) по сравнению с клетками, инкубированными только с ЛПС. Пустые гПЭМК активировали продукцию АФК ($367,28 \pm 6,79\%$) клетками по сравнению с контролем, что обусловлено генерацией АФК в процессе фагоцитоза микрочастиц. Свободные ИБФ и ЛФ не активировали генерацию АФК и снижали уровень ЛПС-стимулированных значений АФК. Снижение ЛПС-активированной продукции АФК «пустыми» гПЭМК, по-видимому, обусловлено электростатическим взаимодействием заряженных микрочастиц с молекулами ЛПС и снижением эффективной концентрации последнего в растворе.

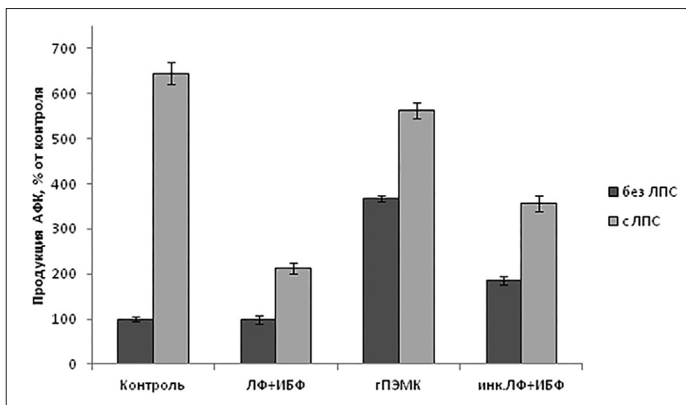


Рис. 1. Влияние инкапсулированных ЛФ и ИБФ на ЛПС-индуцированную продукцию АФК нейтрофилами человека. Время экспозиции 16 часов. Без ЛПС (-LPS) или в присутствии 100 нг/мл ЛПС (+LPS). ЛФ (20 мкг/мл) + ИБУ (5 мкг/мл); гПЭМК – клетки в присутствии пустых микрокапсул; инкубация ЛФ + ИБФ – со-инкапсулированные лактоферрин и ибупрофен. Соотношение микрокапсулы/клетки 2:1

Исследование влияния гПЭМК на ЛПС-индуцированную продукцию АФА перитонеальными макрофагами

Продукция АФА, и в частности оксида азота (NO), представляет собой еще один вид клеточной реакции, направленный против патогенов в активированных нейтрофилах. Стимуляция фагоцитов ЛПС приводит к повышенной генерации NO или экспрессии индуцибельной NO-синтазы. Для анализа продукции АФА проводили оценку уровня NO с помощью реактива Грисса (рис. 2). Известно, что ЛФ снижает синтез NO

при активации ЛПС нейтрофилов [6]. В свою очередь, ИБФ, как показано авторами в работе [3], усиливает продукцию NO, что подтверждается и нашими данными. Как мы видим, свободные ИБФ и ЛФ повышают продукцию АФА по сравнению с контролем, но в то же время снижают ЛПС-индуцированный синтез NO. Исследование влияния инкапсулированных ИБФ и ЛФ на ЛПС-индуцированную продукцию NO у перитонеальных макрофагов крыс продемонстрировало протективное действие, значительно снижая значения NO при стимуляции ЛПС.

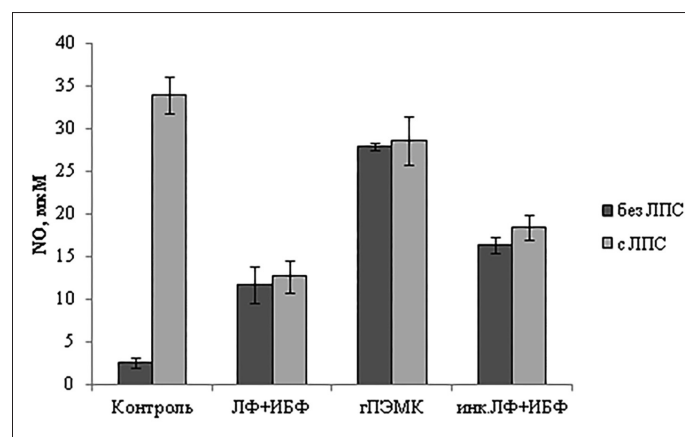


Рис. 2. Влияние инкапсулированных лактоферрина и ибупрофена на продукцию NO тканевыми макрофагами крыс. Клетки (10^6 клеток/мл) инкубировали с микрокапсулами (2×10^6 капсул/мл) в течение 16 ч без ЛПС (-ЛПС) и в присутствии 1 мкг/мл ЛПС (+ЛПС). ЛФ (20 мкг/мл) + ИБУ (5 мкг/мл); гПЭМК – клетки в присутствии пустых микрокапсул; инкубация ЛФ + ИБУ – со-инкапсулированные лактоферрин и ибупрофен. Сравнение столбцов ЛФ + ИБФ в присутствии ЛПС и без него: $p=0,001$ ($n=3$); сравнение столбцов гПЭМК с и без ЛПС: $p=0,001$ ($n=3$)

Исследование влияния гПЭМК на ЛПС-индуцированную продукцию противовоспалительного цитокина ФНО-α

ЛПС взаимодействует с Toll-like рецептором 4 (TLR-4) на мембране фагоцитов, трансдукция сигнала которого в конечном итоге приводит к активации факторов транскрипции (в частности, ядерного фактора NF-κB) и синтезу провоспалительных цитокинов, среди которых первым секретруется ФНО-α. Результаты исследования продукции ФНО-α человеческими макрофагами TLR-1 представлены на рисунке 3. Комбинация двух противовоспалительных агентов ИБФ и ЛФ показывала защитный эффект, сравнимый с действием неинкапсулированного ИБФ и ЛФ, снижая уровень

ЛПС-индуцируемой продукции ФНО- α до 38 пг/мл. Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее [5]. Инкапсулированный ЛФ эффективно снижал ЛПС индуцированную продукцию ФНО на уровне, сопоставимом со свободным белком.

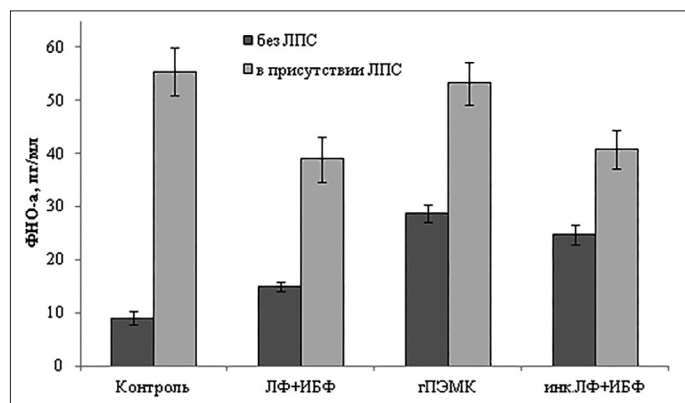


Рис. 3. Влияние инкапсулированных лактоферрина и ибупрофена на секрецию TNF-альфа макрофагами ТНР-1. Клетки ТНР-1 (10^6 клеток/мл) инкубировали с микрокапсулами (2×10^6 капсул/мл) в течение 16 ч без ЛПС (-LPS) и в присутствии 1 мкг/мл ЛПС (+LPS). ЛФ (20 мкг/мл) + ИБР (5 мкг/мл); гПЭМК – клетки в присутствии пустых микрокапсул; инкубация ЛФ + ИБР – со-инкапсулированные лактоферрин и ибупрофен

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют об эффективном инкапсулировании двух соединений ЛФ и ИБР и протективном иммуномодулирующем действии полученных инкапсулированных препаратов. Выявлена эффективная одновременная загрузка гидрофильных и гидрофобных соединений в гПЭМК. Все исследуемые варианты дизайна гПЭМК показали высокую эффективность загрузки ЛФ в полость носителя ($82,34 \pm 0,1$ – $90,1 \pm 1,2\%$). Наличие дополнительного гидрофобного слоя в гПЭМК препятствовало преждевременному выходу белка в среду инкубирования, что представляет собой большое преимущество перед обычными ПЭМК, полученными методом послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов. Кроме того, полученные микроконтейнеры также характеризовались эффективной загрузкой КН. Максимальное количество включалось в микрокапсулы с дизайном OLL (ПАр/ДС)₂. Независимо от состава и толщины полиэлектролитной оболочки, полученные микрокапсулы демонстрировали высокую стабильность при хранении. Исследования влияния ко-

инкапсулированных ИБР и ЛФ в гПЭМК на ЛПС-стимулируемую продукцию АФК, АФА и ФНО-альфа установили существенное протективное действие. Таким образом, полученные гПЭМК – это многофункциональная платформа, обладающая способностью к двойному высвобождению лекарственных соединений и может найти широкое применение в синергетической системе доставки широкого ряда противовоспалительных и противоопухолевых соединений.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в соответствии с исследовательским проектом № 18-315-00429 мол_а.

Литература

1. Chatfield S.M., Thiebmont N., Witko-Sarsat V. Expanding neutrophil horizons: New concepts in inflammation // *J. Innate Immun.* – 2018. – Vol. 10 – No. 5–6. – P. 422–431. doi: 10.1159/000493101.
2. Danafar H., Rostamizadeh K., Davaran S., Hamidi M. Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs by micelles: a new approach using drug conjugated PEG-PCL Nanoparticles // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 2017. – Vol. 43. – No. 11. – P. 1908–1918. doi: 10.1080/03639045.2017.1355922.
3. Daphtary K.M., Heidemann S.M., Glibetic M. Ibuprofen attenuates early lung injury in endotoxemic, neutropenic rats // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. – 2001. – Vol. 65. – No. 2. – P. 59–65. doi: 10.1054/plef.2001.0289.
4. Kochetkova O.Y., Yurinskaya M.M., Evgen'ev M.B., Vinokurov M.G., Shabarchina L.I., Tikhonenko S.A., Zatschina O.G. and Suslikov A.V. Influence of encapsulated heat shock protein hsp70 on the basic functional properties of blood phagocytes // *Doklady Biological Sciences*. – 2015. – Vol. 465. – No. 1. – P. 299–302. doi: 10.1134/S001249661506006X (in Russian).
5. Kochetkova O.Yu., Yurinskaya M.M., Shabarchina L.I., Suslikov A.V., Naumov A.A., Tikhonenko S.A., and Vinokurov M.G. Delivery of lactoferrin to cells using biodegradable microcapsules // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2016. – Vol. 42. – No. 3. – P. 300–304. doi: 10.1134/s1068162016020072.
6. Kruzel M.L., Zimecki M., & Actor J.K. Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – Art. 1438. doi: 10.3389/fimmu.2017.01438.
7. Kunnumakkara A.B., Sailo B.L., Banik K., Harsha C., Prasa, S., Gupta S.C., Bharti A.C., & Aggarwal B.B. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? // *J. Transl. Med.* – 2018. – Vol. 16(1). – Art. 14. doi: 10.1186/s12967-018-1381-2.

8. Luo R., Venkatraman S.S., Neu B. Layer-by-layer polyelectrolyte-polyester hybrid microcapsules for encapsulation and delivery of hydrophobic drugs // *Biomacromolecules*. – 2013. – Vol. 14. – No. 7. – P. 2262–2271. doi: 10.1021/bm4003915.
9. Pang J.M., Luan Y.X., Li F.F., Cai X.Q., Du J.M.; Li Z.H. Ibuprofen-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) films for controlled drug release // *Int. J. Nanomed.* – 2011. – Vol. 6. – P. 659–665. doi: 10.2147/IJN.S17011.
10. Pfister H., Hennet T., Jungi T.W. Lipopolysaccharide synergizes with tumor necrosis factor in cytotoxicity assays // *Immunology*. – 1992. – Vol. 77. – No. 3. – P. 473–476.
11. Ray A., & Dittel B. Isolation of mouse peritoneal cavity cells // *Journal of Visualized Experiments // JoVE*. – 2010. – Vol. 35. – Art. 1488. doi: 10.3791/1488.
12. Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. Matrix polyelectrolyte microcapsules: New system for macromolecule encapsulation // *Langmuir*. – 2004. – Vol. 20. – P. 3398–3406. doi: 10.1021/la036177z.

Список сокращений:

layer-by-layer (LbL) – методика получения микрокапсул;

ПЭМК – микрокапсулы, микроконтейнеры;
гПЭМК – гибридные микрокапсулы;
ПАр – поли-L-аргинин гидрохлорид;
ДС – декстран сульфат натрия;
ЛФ – лактоферрин;
ИБФ – ибупрофен;
КН – красный нил;
PLGA – поли(DL)-лактид-ко-гликолид;
СГР – хитозан/желатин/поли-L-лактид;
OLL – олиго-(L)-лактид;
OLD олиго-(D)-лактид;
АФК – активные формы кислорода;
АФА – активные формы азота;
ФНО-альфа – фактор некроза опухоли-альфа;
ЛПС – липополисахарид, эндотоксин;
ПВА – поливиниловый спирт;
ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат;
ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат;
НВТ – нитросиний тетразолий;
ФосСБ – фосфатно-солевой буфер;
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

CO-DELIVERY OF HYDROPHYLIC AND HYDROPHOBIC COMPOUNDS USING HYBRID POLYELECTROLYTE MICROCAPSULES

O.Yu. KOCHETKOVA, O.Yu. ANTONOVA

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region

Here, we present a successful strategy for combined encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds in a single microcontainer. Hybrid microcapsules (hPEMC) were produced by modified methods of layer-by-layer assembly of oppositely charged electrolytes on the surface of a carbonate particle, and gelatination. Efficient combination loading of hydrophilic and hydrophobic compounds into hPEMC has been demonstrated. All the designed versions of hPEMC have shown high efficiency of lactoferrin loading into the internal phase ($82,34 \pm 0,1 - 90,1 \pm 1,2$). The microcontainers were also characterized by high loading of Nile Red into the hydrophobic layer. Maximum loading was achieved for the microcapsules with the OLL composition (PAr/DS)₂. The resulting microcapsules were characterized by high storage stability regardless of their composition and the thickness of the hydrophobic layer. Analysis of the effect of hPEMC with co-encapsulated ibuprofen and lactoferrin on LPS-stimulated production of reactive oxygen and nitrogen species, and tumor necrosis factor- α has demonstrated potent protective activity. The advantages of the dual system for combination delivery of therapeutic compounds are the synergy between the different pharmacological components and the ability to regulate the relative dose of each drug using a single integrated carrier.

Keywords: microcapsules, hydrophilic and hydrophobic compounds, drug delivery, ibuprofen, lactoferrin.

КОСМЕТИКА И МИКРОБИОМ. ОБЗОР О ВЛИЯНИИ РЯДА ИНГРЕДИЕНТОВ КОСМЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА МИКРОФЛОРУ КОЖИ

И.Н. САМЕТОВА*, Р.Г. ВАСИЛОВ

НИЦ «Курчатовский институт», Москва

В обзоре рассматривается микробиом как совокупность хорошо сбалансированных комменсальных, симбиотических и патогенных микроорганизмов, который отвечает за предотвращение колонизации и инвазии патогенами и модулирует врожденный и адаптивный иммунитет. Микробиом кожи помогает ограничивать вредное воздействие аллергенов, ультрафиолетовых лучей, загрязнений и других повреждающих агентов окружающей среды. Кожа остается здоровой, когда бактериальная экосистема сбалансирована и дифференцирована. Микробное разнообразие используется в качестве надежного индикатора здоровья кожи. Использование косметических средств может вызвать дисбаланс и привести к появлению кожных заболеваний, таких как акне, перхоть, экзема, розацеа, а может и восстановить баланс микробиоты кожи путем регулирования роста вредных и полезных микроорганизмов. При разработке косметических средств необходимо с должным вниманием подходить к подбору ингредиентов, как функциональных (консерванты, масла и эмульгаторы), так и активных ингредиентов, которые воздействуют на микробиоту кожи.

Ключевые слова: микробиом, кожа, косметика.

Введение

Микробиота кожи человека состоит из разнообразных микроорганизмов, таких как бактерии, грибы, вирусы и членистоногие (клещи). Наиболее распространенные бактерии, обитающие на коже человека, можно разделить на 4 типа: *Actinobacteria* — 52% (*Micrococcus*, *Propionebacterium*, *Corynebacteria*), *Firmicutes* — 24% (*Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), *Proteobacteria* — 16% (*Paracoccus*, *Haematobacter*, *Sphingomonas*), *Bacteroidetes* — 5% (грамотрицательные, не образующие спор анаэробные палочковидные бактерии). Грибы составляют 1–22% филогенетического состава микробиома кожи, в основном представлены родом *Malassezia* (80% от грибов кожи).

Микроорганизмы кожи обнаруживаются не только в эпидермисе, но также в более глубоких слоях кожи, таких как дерма и подкожная жировая клетчатка. Таким образом, происходит взаимодействие между бактериями и различными клетками кожи в тканях, раньше считавшихся стерильными [18]. Это необходимо учитывать при

разработке косметических средств, которые могут проникать в более глубокие слои кожи. Активность косметических ингредиентов можно оценить по их воздействию *in vitro* и *in vivo* на такие бактерии, как *Staphylococcus epidermidis* (составляет 90% всей аэробной резидентной микробиоты) и *Propionebacterium acnes*, две основные комменсальные грамположительные бактерии кожной микробиоты, которые широко распространены по всему организму человека [10].

Косметические ингредиенты

Консерванты

Косметические средства для ухода за кожей, такие как крем, гель, лосьон, мыло и др., содержат консерванты, эмульгаторы, загустители и другие функциональные и активные ингредиенты, которые влияют на микробиоту кожи.

Основное влияние на микробиом кожи оказывают консерванты.

Консерванты добавляются в косметические составы для ингибирования роста микробов и обеспечение безопасности продукта. Они могут оказывать также ингибирующее действие на бактерии, обитающие в коже, но в пределах предписанного диапазона эти консерванты безопасны. Однако из-за того, что консерванты в косметических продуктах остаются активными на коже, их продолжительное использование, вероятно, изменяет резидентную микробную флору кожи. Различные кон-

© 2020 г. Саметова И.Н., Василев Р.Г.

* Автор для переписки:

Саметова Ирина Николаевна,
лаборант-исследователь НИЦ «Курчатовский институт», отдел
биотехнологии и биоэнергетики
E-mail: irinasametova@gmail.com

серванты оказывают различное специфическое ингибирующее действие на местную флору.

В работе [23] были исследованы *in vitro* пять основных химических консервантов, используемых в косметических продуктах: феноксиэтанол (ФЭ), этилгексилглицерин (ЕНГ), метилизотиазолинон (МТИ), йодопропинилбутилкарбамат (IPBC) и метилпарабен (МП) в концентрациях, соответствующих верхним пределам предписанного диапазона. ФЭ оказывал самое мягкое воздействие на все исследуемые бактерии. ФЭ и МП меньше влияли на кожно-резидентные бактерии, чем на два условно патогенных микроорганизма, в то время как ЕНГ, МТИ и IPBC вызывали сильный тормозящий эффект на бактерии-резиденты кожи в концентрациях, которые ингибировали как *S. aureus*, так и *E. coli*.

В другом исследовании [14] было обнаружено, что применение феноксиэтанол-содержащих косметических средств нарушало микробиоту кожи таким образом, что увеличивалось количество *Proteobacteria phylum*, *4P004125_s* и *Propionibacterium acnes species* и снижалось количество *Propionibacterium humerusii*. Наиболее сильное антимикробное действие против патогенных бактерий *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa* проявляли парабены, в частности, пропилпарабен, за которым следовали феноксиэтанол и 1,2-гександиол. Что касается исследования консервантов в отношении микробов, выделенных с кожи лиц людей, оказалось, что 1,2-гександиол, в отличие от других консервантов, не полностью подавлял рост ряда резидентных бактерий человеческой кожи (*Shigella flexneri*, *Enterobacter aerogenes*, *Kluyvera cryocrescens* и *Bacillus safensis*).

Сообщают, что такие консерванты, как парабены, редко раздражают или сенсibilизируют нормальную кожу человека в концентрациях, используемых в косметике. И хотя они действительно проникают в роговой слой, метаболизм парабенов происходит в пределах жизнеспособной кожи, что, вероятно, приведет к тому, что только 1% неметаболизированных парабенов будет доступен для всасывания. Многие пациенты, чувствительные к парабенсодержащим препаратам, могут носить косметику, содержащую эти ингредиенты, без каких-либо побочных эффектов [9]. Парабены уже хорошо изучены, в то время как новые замещающие продукты, не столь хорошо известные, могут привести к новым случаям отравления и контактной аллергии [6]. Согласно регламенту FDA, метилпарабен и пропилпарабен обычно признаются безопасными (GRAS) при использовании в качестве химических консервантов в готовых косметических продуктах с пределом использования 0,19% для

каждого. В то же время Европейский союз ограничил включение парабенов в состав косметики. В частности, в косметических продуктах запрещено использование бензилпарабена, изобутилпарабена, изопропилпарабена, метилпарабена и фенилпарабена (Регламент (ЕС) № 358/2014) [3].

Также известно, что консерванты, включая формальдегид и высвобождающие формальдегид вещества, изотиазолиноны, йодопропинилбутилкарбамат, парабены, тимеросал и триклозан, могут вызывать аллергический и раздражающий контактный дерматит, и все больше имеется доказательств того, что некоторые из них могут даже вызывать токсические эффекты. Кроме этого, весьма тревожно, что некоторые устойчивые к консервантам бактериальные штаммы, выделенные из косметических средств, проявляют определенную степень перекрестной резистентности к антибиотикам [13].

Авторы [1] нашли, что использование консервантов в косметике для предотвращения роста микроорганизмов может оказать антимикробное действие и на нормальную флору кожи. Так, из исследованных 22 косметических средств только 4 продукта не изменяли микробиоту кожи. Также было замечено, что те косметические средства, которые не ингибируют некоторые специфические микроорганизмы в дозе 100 мг/мл, также не ингибируют микроорганизмы в дозе 400 мг/мл.

Таким образом, консерванты должны использоваться в самой низкой концентрации, которая обеспечивает их эффективность, а также должна быть изучена и оценена их остаточная активность. Все это должно быть определено в процессе разработки продукта. Соблюдение принципов надлежащей производственной практики (GMP), выбор соответствующей упаковки и типа рецептуры, низкая активность воды и высокие или низкие значения рН служат значимыми переменными для контроля роста микробов в косметических препаратах.

Альтернатива консервантам, используемым в косметике

Из-за неоднозначного влияния синтетических консервантов большое внимание уделяется возможности применения природных компонентов для создания консервирующей системы.

Одним из подходов к минимизации негативных эффектов от консервантов (аллергия, дерматит, перекрестная резистентность к антибиотикам некоторых устойчивых к консервантам бактериальных штаммов) является использование консервантов-бустеров или создание самосохраняющихся (без консервантов) косметических составов. В самоконсервирующихся препаратах традиционные консер-

ванты заменяют на другие косметические ингредиенты с антимикробными свойствами, которые еще не признаны Европейским Научным комитетом в качестве консервантов. Бустеры консервантов определяются как косметические ингредиенты с антимикробными свойствами, которые позволяют значительно снизить концентрацию синтетических консервантов, используемых в косметических продуктах. Кроме того, консерванты-ускорители проявляют не только антимикробную активность, но и многие из них обнаруживают другие желательные свойства, полезные в косметических продуктах (например, увлажняющие, антиоксидантные и др.).

В статье [11] представлен обзор косметических ингредиентов с антимикробной активностью для уменьшения или устранения количества синтетических консервантов и также описан механизм их действия. Правильно подобранные ингредиенты с антимикробной активностью позволяют уменьшить или исключить использование консервантов в рецептуре косметических средств. Но зачастую альтернативные консерванты имеют ряд недостатков: отсутствие широкого спектра действия и низкая эффективность при низких концентрациях, неприятный запах или цвет, плохая совместимость с другими ингредиентами, раздражающий или аллергенный потенциал, высокая стоимость.

Р-анисовая, бензойная, дегидроуксусная кислоты, салициловая и сорбиновая кислоты, комбинация дегидроуксусной кислоты и бензилового спирта, глицерилкаприлат и этанол эффективно защищают косметические составы с высоким содержанием воды даже при минимальной изученной концентрации. Экстракт семян грейпфрута, фермент лактобацилл и левулиновая кислота должны использоваться в максимально рекомендуемой концентрации. Кроме того, фермент лактобацилл и левулиновая кислота должны применяться в сочетании с другими консервантами, которые эффективны против дрожжей.

Этилгексилглицерин действует как усилитель консервантов благодаря своему поверхностно-активному строению. Он влияет на межфазное натяжение на клеточной мембране микроорганизмов, позволяя консерванту проникать более эффективно. Гликоли как увлажнители могут влиять на активность воды и, как следствие, на сохранность косметических составов. Неионные поверхностно-активные вещества в низких концентрациях влияют на проницаемость наружной мембраны у грамотрицательных бактерий, но иногда могут инактивировать некоторые консерванты (например, парабены, феноксиэтанол) за счет образования с ними мицелл. Фенольные соединения, такие как кофейная, кумаровая

и феруловая кислоты, также обладают антимикробной активностью. Фенолы действуют, разрушая клеточные мембраны и неспецифически денатурируя цитоплазму, клеточную стенку и мембраны. Хелатирующие агенты, не обладая собственной антимикробной активностью (то есть ЭДТА, молочная, лимонная и фитиновая кислоты), повышают проницаемость клеточных мембран и повышают их чувствительность к антимикробным агентам. Оксид цинка проявляет антимикробную активность в отношении различных штаммов бактерий в концентрации выше 1%.

Особое внимание нужно уделить растительным консервантам (эфирные масла, растительные экстракты и их активные компоненты), набирающим все большую популярность в качестве альтернативы синтетическим консервантам. Эфирные масла и экстракты как самоконсервирующиеся природные системы экономически эффективны, а в некоторых случаях могут повысить дермокосметические свойства конечного продукта. Но их применение в качестве противомикробных добавок в косметических препаратах не всегда оправданно. Во-первых, они гораздо более специфичны, чем синтетические консерванты, и поэтому должны быть тщательно отобраны, чтобы защитить продукт от широкого спектра микроорганизмов. Во-вторых, в некоторых случаях они аллергенны. Кроме того, эфирные масла, как правило, обладают сильным запахом при использовании в эффективных концентрациях, что может быть весьма некомфортно. В некоторых случаях наблюдалось уменьшение их антимикробного действия из-за нестабильности и липофильности.

Антимикробные свойства морских водорослей известны с давних времен и хорошо документированы в последние годы и, таким образом, они представляют интерес для потенциального использования в косметических средствах. Морские водоросли обладают способностью убивать грибки и вредные бактерии, сохраняя флору кожи в состоянии равновесия.

Такие вещества, как микробные метаболиты, вводимые местно в качестве консерванта, считаются безопасными и относительно свободными от побочных эффектов. Кроме того, местное применение микробных метаболитов представляется недорогим вариантом лечения многих кожных заболеваний, включая вульгарные угри, атопический дерматит и псориаз.

Также рост микроорганизмов может быть подавлен самой формулой, например, масло ши и глицерин обладают антимикробными свойствами (адекватная антимикробная эффективность в тестах challenge на *A. brasiliensis* и *S. aureus*).

Влияние базовых компонентов косметических средств на микробиом

В статье [8] авторы исследовали влияние косметических ингредиентов *in vitro* (которые используются в больших количествах — более 2% — в рецептурах) на вид рода *Malassezia*, а также на некоторые преобладающие бактерии: *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus* spp. — в маслянистых участках, и *Corynebacterium* spp. и *Staphylococcus* spp. — во влажных местах. Также была разработана рецептура, основанная на нейтральных к микробиому кожи ингредиентах. Рост всех *Malassezia* spp. наблюдался в присутствии натуральных масел и восков, сложных эфиров свободных кислот и жирных спиртов с длиной жирной цепи более 12 атомов углерода. В отличие от этого, рост не наблюдался в присутствии эфиров жирных спиртов (например, ceteth-20, oleyl-20, laureth 20, steareth-20, cetearyl glucoside), вторичных жирных спиртов (например, октилдодеканол), веществ на основе парафина и кремния, полимеров (например, гидроксиэтилакрилат/акрилоилдиметилтаурат натрия сополимер, цетиловый ПЭГ / ППГ-10/1 диметикон, полосаксер 407, акрилаты / C10-30 алкилакрилат кросс-полимер), полиэтиленгликолей, четвертичных аммониевых солей (например, пальмитамидопропилтримоний хлорид) и сложных эфиров гидрокси-жирных кислот (гидроксиэфиров жирных кислот), а также жирных кислот и сложных эфиров жирных кислот с длинами жирных цепей менее 12 атомов углерода.

В исследовании *in vivo* [5] было выявлено, что многие соединения из косметических средств сохраняются на коже в течение нескольких недель после их использования, что предполагает долгосрочный вклад в химическую среду, в которой живут микробы кожи. Было установлено, что полиэтиленгликоль вымывается из кожи быстрее, чем полипропиленгликоль (HL ~0,5 недели против ~1,9 недели), и быстрее, чем жирные кислоты, используемые в лосьонах (HL ~1,2 недели), что согласуется с их гидрофильными (PEG) и гидрофобными свойствами. Молекулярная и бактериальная временная изменчивость является специфичной для продукта, части тела, где он используется, и человека, и изменения наблюдаются, начиная с первой недели использования косметического продукта. Эти данные свидетельствуют о длительном накоплении этих соединений на коже, что позволяет предположить возможность снижения их дозы в дезодорантах или частоты применения и, следовательно, уменьшения степени воздействия таких соединений.

В экспериментальном исследовании [15] кожу предплечья здоровых добровольцев обрабатывали

кремами, содержащими запатентованные полимеры, разработанные компанией Ashland Specialty Ingredients. Поскольку ожидается, что высокомолекулярные полимеры не будут проникать в роговой слой, их воздействие на эпидермис будет обусловлено физическими изменениями свойств рогового слоя, а не в результате действия обычных биоактивных косметических ингредиентов. Для оценки суррогатных маркеров барьерной функции эпидермиса были измерены такие параметры, как трансэпидермальная потеря влаги (TEWL), гидратация, колориметрия (покраснение) и pH. Важно, чтобы при местном применении препараты не вызывали изменений в свойствах эпидермального барьера кожи и не вызывали экспрессии модуляторов воспаления (цитокинов или хемокинов). После 4 дней местного многократного применения двух различных полимеров, входящих в состав косметических кремов, TEWL, цвет и pH существенно не отличались от исходного состояния.

Авторы [22] наблюдали изменения в разнообразии микробиома кожи, влажности и TEWL, которые были вызваны в ответ на использование косметического продукта. Был сделан вывод, что чем больше синтетических ингредиентов содержится в продукте, тем в меньшей степени он оказывает положительное влияние на среднее биоразнообразие, особенно в течение первых двух недель.

Влияние увлажнения кожи

Наиболее часто преждевременному старению и заболеваниям подвергается именно сухая кожа. Гидратация оказывает существенное влияние на биофизические параметры кожи, такие как трансэпидермальная потеря воды (TEWL) и шероховатость кожи, а также на микробное сообщество кожи.

Lee H.J., Jeong S.E. et al. [17] оценили влияние гидратации кожи на бактериальные сообщества и биофизические параметры кожи лица. Для этого были выбраны добровольцы с высоким и низким уровнем гидратации кожи, которые в течение 4 недель использовали косметические средства, повышающие уровень увлажнения кожи. В результате в обеих группах после применения увлажняющих средств наблюдалось повышение уровня гидратации и уменьшение TEWL и шероховатости кожи, а также значительно увеличилось бактериальное разнообразие. После использования базовой косметики произошло увеличение *Ralstonia*, недоминирующего рода на коже человека, и значимое уменьшение количества *Propionibacterium*. Однако исследование свидетельствует, что увлажнение не является единственным ключевым параметром, влияющим на состояние микробиома кожи; было констатировано, что бактериальные сообщества

сухой кожи при ее увлажнении не изменились до сходства с сообществами, которые находятся в нормальной коже.

В другом исследовании [21] также были продемонстрированы сильные признаки корреляции между микробным разнообразием и влажностью кожи. Доказательств линейной корреляции между микробным разнообразием кожи и показателями TEWL не было найдено, так же, как и не было обнаружено твердой линейной зависимости между разнообразием и рН, а также между TEWL и уровнем увлажненности кожи.

рН кожи

Физиологичный рН здоровой поверхности кожи большинства частей тела является кислым и находится в диапазоне рН 4,1–5,8 (в среднем 4,9) [16, 19]. На нормальную резидентную флору положительно влияет физиологическая кислая среда, тогда как большинство патогенных бактерий нуждается в значении рН более 6; в то же время их рост подавляется при более низких значениях рН. Например, для роста *S. aureus* оптимальным представляется значение рН 7,5, а при рН 5,0 рост подавляется. Помимо прямого воздействия кислотности, рН регулирует активность антимикробных пептидов. Также с рН связана десквамация, кислый рН регулирует KLK5 и KLK7, снижая, но не полностью подавляя их активность и поддерживая физиологическое шелушение [7].

Кожные воспалительные заболевания, сухая, стареющая и зудящая кожа демонстрируют повышенный рН. Увеличение рН ускоряет процесс и уменьшает разнообразие микрофлоры кожи. Распространенные средства по уходу за кожей часто имеют рН 5,5 или выше, что может привести к высыханию кожи, оставляя ее склонной к инфекциям и преждевременному старению [22]. Было установлено, что кожа со значениями рН ниже 5,0 находится в лучшем состоянии, чем кожа со значениями рН выше 5,0, что подтверждается измерением биофизических параметров барьерной функции кожи. Также уровень рН влияет на адгезию резидентной микрофлоры кожи; кислотный рН кожи (4–4,5) удерживает прикрепленную к коже резидентную бактериальную флору, а щелочной рН (8–9) способствует рассредоточению от кожи.

В исследовании [4] оценивали возможную нормализацию рН поверхности кожи у пожилых людей и улучшение барьерной функции за счет применения средств по уходу за кожей \approx рН 4,0. С возрастом рН поверхности кожи увеличивается до 6. Повышенный рН коррелирует со снижением целостности/сцепление барьера. Было оценено влияние эмульсий масло / вода при значениях рН 3,5, 4,0, 4,5 и 5,5 на рН поверхности кожи, гидратацию и целостность барьера. Повышенный

базовый уровень рН поверхности кожи пожилых людей нормализуется до физиологического рН 4,5–5,0 в течение 7 часов после однократного применения эмульсий с рН 3,5 или 4,0. Длительный кислотный уход за кожей (рН 3,5–4,0) нормализует повышенный рН кожи у пожилых людей, улучшает целостность эпидермального барьера и, следовательно, уменьшает проблемы с кожей у лиц данного возраста.

Даже небольшие изменения рН могут значительно изменить барьерную функцию кожи, воздействуя на ферменты, необходимые для поддержания и восстановления барьера [15]. Различные заболевания и состояния можно значительно улучшить с помощью препаратов для местного применения с кислым рН и соответствующей буферной системой.

Активные вещества для поддержания микробиома. Пребиотики, про- и постбиотики

К видам активных веществ, используемых в продуктах по уходу за кожей микробиоме, относятся пребиотики, пробиотики и постбиотики. Большинство таких используемых веществ — это либо пре-, либо постбиотики.

Пребиотики: пищевые добавки или продукты, содержащие неперевариваемый ингредиент, который избирательно стимулирует рост и/или активность местных бактерий, — олигосахариды, инулин, простые сахара, альфа-глюконовый олигосахарид, длинноцепочные бета-глюканы и другие. Ниацинамид (витамин В3) может действовать как пребиотик путем увеличения естественных антимикробных пептидов в коже (EP2742942, Unilever, 6/18/14). Было показано, что ниацинамид, содержащийся в составе дезинфицирующего средства для рук, повышает собственные защитные свойства кожи и обеспечивает длительную защиту от *E. coli* в течение до 6 часов после нанесения. Ниацинамид также повышает уровень антимикробных пептидов в коже, таких как Псориазин. Ферментированный экстракт овса, ферментированные экстракты водорослей, ферментированный мед, ферментированные растительные масла и другие ферментированные продукты положительно влияют на состояние микробиома. После обработки бактериями натуральные ингредиенты приобретают новые свойства и лучше усваиваются кожей. В их состав входит гораздо больше витаминов, минералов и аминокислот по сравнению с теми же ингредиентами в сыром виде, а их рН-уровень более кислотный — все это отвечает за восстановительный и омолаживающий эффекты на коже. Влияние галактоолигосахаридов (GOS) на баланс микробиоты кожи в составе косметической сыворотки было оценено в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом исследовании.

Было выявлено, что применение косметической сыворотки, содержащей GOS, приводило к росту молочнокислых бактерий, которые могут иметь увлажняющий эффект, и подавлению вредных микробов кожи (снижению количества *S. aureus*). Также увеличивалась влагоудерживающая способность кожи и снижалась трансэпидермальная потеря влаги [12].

Пробиотики: пищевые добавки или продукты, содержащие жизнеспособные микроорганизмы, которые изменяют микрофлору хозяина. ВОЗ определяет пробиотик как живой организм. Однако зачастую в косметической промышленности используются фрагменты бактерий или неживые бактерии (деактивированы с помощью тепла), но которые, по сообщениям, ведут себя как живые и приносят пользу живому существу. В косметике часто используют лизаты бактерий, которые получают путем ферментативного гидролиза бактериальных клеток. Лизаты включают в себя фрагменты клеточной стенки и их внутриклеточного содержимого. Примеры лизатов, используемых в косметике: *Bifida Ferment Lysate*, *Lactobacillus Ferment Lysate*, *Propionibacterium Lysate*, *Lactococcus Ferment Lysate* и другие.

Постбиотики: нежизнеспособные бактериальные продукты или побочные продукты от пробиотических микроорганизмов, которые обладают биологической активностью в организме хозяина.

Комбинация пробиотиков и пребиотиков получила название «синбиотическая», где субстраты могут увеличивать выживаемость пробиотических штаммов. Ученые обнаружили, что пребиотики повышают выживаемость и продлевают период удержания специфических пробиотиков, обрабатывая мышью соевым олигосахаридом, фруктоолигосахаридами или инулином, а затем пробиотиками. Синбиотики обладают способностью оптимизировать, поддерживать и восстанавливать микробиоту кожи системно или путем местного применения. Одну из основных проблем при местном применении пробиотиков, даже в синбиотических препаратах, представляют суровые условия окружающей среды кожи, которые препятствуют колонизации. Однако, в отличие от пробиотиков, любая потенциальная эффективность пребиотика сохраняется в рецептуре из-за относительной стабильности углеводов (даже в относительно жестких форматах) [2].

Заключение

Контроль состояния микробиома и определение влияния на него косметических ингредиентов — это тренд, это новое перспективное направление, кото-

рое еще до конца не изучено. Взаимодействие между микроорганизмами-хозяевами кожи и ингредиентами косметических средств гораздо сложнее того, что можно воссоздать в экспериментах *in vitro*. Восстановление баланса микрофлоры кожи способно решить многие проблемы, включая заболевания кожи. Именно разнообразие микробиоты может гарантировать здоровье кожного покрова. Такое явление повторяется во всей природе, где высокое биоразнообразие всегда приводит к здоровым экосистемам [20].

Работа выполнена в рамках тематического плана НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Adegoke T.V., Arotupin D.J., Ekundayo T.C. Antimicrobial activities of some commercial cosmetics on selected cutaneous microflora // Journal of Advances in Microbiology. — 2017. — Vol. 4(4). — P. 1–9.
2. Al-Ghazzawi F.H., & Tester R.F. Impact of prebiotics and probiotics on skin health // Beneficial Microbes. — 2014. — Vol. 5(2). — P. 99–107.
3. Belal M., Mahmood S., Iqbal H.M.N. The beast of beauty: Environmental and health concerns of toxic components in cosmetics // Cosmetics. — 2020. — Vol. 7. — Art. 13. doi: 10.3390/cosmetics7010013.
4. Blaak J., Wohlfart R. & Schürer N.Y. Treatment of aged skin with a pH 4 skin care product normalizes increased skin surface pH and improves barrier function: Results of a pilot study // Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications. — 2011. — Vol. 1. — P. 50–58.
5. Bouslimani A., da Silva R., Kosciolk T., Janssen S., Callewaert C., Amir A., Dorrestein K., Melnik A.V., Zaramela L.S., Kim J.N., Humphrey G., Schwartz T., Sanders K., Brennan C., Luzzatto-Knaan T., Ackermann G., McDonald D., Zengler K., Knight R., Dorrestein P.C. The impact of skin care products on skin chemistry and microbiome dynamics // BMC Biol. — 2019. — Vol. 17(1). — Art. 47. doi: 10.1186/s12915-019-0660-6.
6. Castelain F., Castelain M. Parabens: a real hazard or a scare story? // Eur. J. Dermatol. — 2012. — Vol. 22(6). — P. 723–727.
7. Caubet C., Jonca N., Brattsand M., Guerrin M., Bernard D., Schmidt R., Egelrud T., Simon M., Serre G. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7 // J. Invest. Dermatol. — 2004. — Vol. 122(5). — P. 1235–1244.
8. Dobler D., Schmidts T., Wildenhain S., Seewald I., Merzhäuser M., & Runkel F. Impact of selected cosmetic ingredients on common microorganisms of healthy human skin //

- Cosmetics. — 2019. — Vol. 6(3). — Art. 45. doi: 10.3390/cosmetics6030045.
9. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products // *Int. J. Toxicol.* — 2008. — Vol. 27, Suppl. 4. — P. 1–82. DOI: 10.1080/10915810802548359.
 10. Fournière M., Latire T., Souak D., Feuilloy M.G.J., Bedoux G. *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics // *Microorganisms.* — 2020. — Vol. 8(11). — Art. 1752. doi: 10.3390/microorganisms8111752.
 11. Herman A. Antimicrobial ingredients as preservative booster and components of self-preserving cosmetic products // *Current Microbiology.* — 2019. — Vol. 76(6). — P. 744–754.
 12. Hong K.B., Hong Y.H., Jung E.Y., Jo K., Suh H.J. Changes in the diversity of human skin microbiota to cosmetic serum containing prebiotics: Results from a randomized controlled trial // *J. Pers. Med.* — 2020. — Vol. 10(3). — Art. 91. doi: 10.3390/jpm10030091.
 13. Hughes O.B., Maderal A.D., Tosti A. Preservative sensitization — safety with and safety without // *Current Treatment Options in Allergy.* — 2016. — Vol. 3. — P. 345–358.
 14. Jeong J.J., Kim D.H. Effects of cosmetics and their preservatives on the growth and composition of human skin microbiota // *J. Soc. of Cosmetic Sci. of Korea.* — 2015. — Vol. 41(2). — P. 127–134.
 15. Kelchen M.N., Menon G., Ten Eyck P., Pretty paul D., & Brogden N.K. A pilot study to evaluate the effects of topically applied cosmetic creams on epidermal responses // *Skin Pharmacology and Physiology.* — 2018. — Vol. 31(5). — P. 269–282.
 16. Lambers H., Piessens S., Bloem A., Pronk H., & Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora // *International Journal of Cosmetic Science.* — 2006. — Vol. 28(5). — P. 359–370.
 17. Lee H.J., Jeong S.E., Lee S., Kim S., Han H., Jeon C.O. Effects of cosmetics on the skin microbiome of facial cheeks with different hydration levels // *Microbiologyopen.* — 2018. — Vol. 7(2). — e00557. doi: 10.1002/mbo3.557.
 18. Nakatsuji T., Chiang H.I., Jiang S.B., Nagarajan H., Zengler K., Gallo R.L. The microbiome extends to sub-epidermal compartments of normal skin // *Nat. Commun.* — 2013. — Vol. 4. — Art. 1431. doi: 10.1038/ncomms2441.
 19. Proksch E. pH in nature, humans and skin // *J. Dermatol.* — 2018. — Vol. 45(9). — P. 1044–1052.
 20. Wallen-Russell C., Wallen-Russell S. Meta analysis of skin microbiome: New link between skin microbiota diversity and skin health with proposal to use this as a future mechanism to determine whether cosmetic products damage the skin // *Cosmetics.* — 2017. — Vol. 4. — Art. 14. doi: 10.3390/cosmetics4020014.
 21. Wallen-Russell C. Is there a relationship between transepidermal water loss and microbial biodiversity on the skin? // *Cosmetics.* — 2019. — Vol. 6. — Art. 18. doi: 10.3390/cosmetics6010018.
 22. Wallen-Russell C. The role of every-day cosmetics in altering the skin microbiome: A study using biodiversity // *Cosmetics.* — 2019. — Vol. 6. — Art. 2. doi: 10.3390/cosmetics6010002.
 23. Wang Q., Cui S., Zhou L., He K., Song L., Liang H., He C. Effect of cosmetic chemical preservatives on resident flora isolated from healthy facial skin // *J. Cosmet. Dermatol.* — 2019. — Vol. 18(2). — P. 652–658.

COSMETICS AND THE MICROBIOME. AN OVERVIEW OF THE EFFECTS OF A RANGE OF INGREDIENTS IN COSMETICS ON THE MICROFLORA OF THE SKIN

I.N. SAMETOVA, R.G. VASILOV

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

The review considers the microbiome as a set of well-balanced commensal, symbiotic and pathogenic microorganisms, which is responsible for the prevention of colonization and invasion by pathogens and modulates innate and adaptive immunity. The skin microbiome helps limit the harmful effects of allergens, UV rays, pollution, and other environmental damaging agents. The skin remains healthy when the bacterial ecosystem is balanced and differentiated. Microbial diversity is used as a reliable indicator of skin health. The use of cosmetics can cause imbalances and lead to skin conditions such as acne, dandruff, eczema, rosacea, and can restore the balance of the skin microbiota by regulating the growth of harmful and beneficial microorganisms. When developing cosmetics, it is necessary to carefully approach the selection of ingredients, both functional (preservatives, oils and emulsifiers) and active ingredients that affect the skin microbiota.

Keywords: microbiome, skin, cosmetics.

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ УСТОЙЧИВОЙ СИСТЕМЫ ОБРАЩЕНИЯ С ТВЕРДЫМИ КОММУНАЛЬНЫМИ ОТХОДАМИ

Т.Н. ГАЕВА*, Р.Г. ВАСИЛОВ

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

В обзоре представлен анализ современных технологий переработки твердых коммунальных отходов (ТКО), которые обладают высоким экологическим и социально-экономическим потенциалом и могут быть интегрированы в систему обращения с ТКО, придавая ей значительную эффективность и устойчивость. Дана оценка преимуществ комплексного междисциплинарного подхода к использованию технологий переработки ТКО, что требует большего внимания к участию социума в формировании системы обращения с ТКО и развития спектра технологий социогуманитарной направленности. Показаны возможности и перспективы развития технологий термохимической переработки ТКО.

Ключевые слова: экология, устойчивая система обращения с ТКО, циркулярная экономика, биоэкономика, термохимическая переработка отходов, сжигание, пиролиз, газификация, промышленное компостирование, социогуманитарные технологии.

Введение

Все глобальные вызовы, с которыми человечество сталкивается в XXI веке, так или иначе связаны с нарастанием глубинного конфликта между техносферой, биосферой и обществом или, иными словами, между научно-техническим прогрессом, природной средой и человеком. Стремительное развитие технологий, быстрый рост промышленности, энергетики, транспорта, ускорение процессов урбанизации, повышение уровня жизни и потребления выдвинули на одно из первых мест проблему загрязнения окружающей среды отходами производства и потребления, включая твердые коммунальные отходы, на долю которых приходится до 30% общего объема отходов [28].

В соответствии с действующим российским законодательством к ТКО относят отходы, образующиеся в жилых помещениях в процессе потребления физическими лицами, товары, утратившие свои потребительские свойства, а также отходы, образующиеся в процессе деятельности юридических лиц и подобные по составу отходам, образующимся в жилых помещениях [25]. Виды отходов, относящиеся к ТКО, определены Федеральным

классификационным каталогом отходов, утвержденным приказом Росприроднадзора № 242 от 22.05.20 [27].

Растущее загрязнение окружающей среды отходами оказывает негативное влияние на здоровье человека, наносит ущерб природным экосистемам при проникновении продуктов распада в атмосферу, почву и воду, значительно увеличивает выбросы парниковых газов (ПГ), вносит вклад в глобальное потепление и изменение климата. Дальнейший рост и накопление ТКО, наряду с экстенсивным природопользованием, обуславливают переход биосферы к неустойчивому, то есть кризисному состоянию.

Усиление указанных негативных тенденций поставило общество перед необходимостью выбора дальнейшего пути развития науки и технологий между технократическим и биосферосовместимым направлениями. Как следует из Стратегии научно-технического развития Российской Федерации, важнейшим приоритетом, обозначенным в пункте 20ж документа, устанавливается, что научно-технологический прогресс в нашем государстве будет происходить в направлении разрешения конфликта между природой, человеком и технологиями, что обеспечивается свободным развитием личности и социума в гармонии с природной средой на принципах ресурсосбережения, энергоэффективности, использования возобновляемых источников и природоподобных технологий [23].

Большой шаг на этом пути будет сделан решением проблемы роста и накопления отходов потребления за счет

© 2020 г. Гаева Т.Н., Василев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Гаева Татьяна Николаевна

канд. биол. наук, заместитель начальника отдела НИЦ «Курчатовский институт»

E-mail: gaeva@mail.ru

создания эффективной и устойчивой системы обращения с ТКО. Такая система представляет собой сложный механизм целенаправленной и скоординированной деятельности по осуществлению комплекса различных мероприятий по сбору, транспортировке, разделению, хранению, утилизации и/или ликвидации ТКО, прогнозированию и моделированию социально-экономических, экологических и демографических процессов с целью минимизации перспективных потоков ТКО, а также контроль, мониторинг и регулирование в сфере обращения с ТКО. Уровень организации и функционирования системы обращения с ТКО напрямую влияет на важнейший показатель социально-экономического развития государства — индекс развития человеческого потенциала (ИРЧП).

Принципы устойчивости в системе обращения с ТКО

Общий мировой объем ТКО в 2016 г. составил около 2,02 млрд т и, по прогнозным оценкам, к 2030 г. вырастет до 2,59 млрд т, а к 2050 г. достигнет 3,4 млрд т [29]. В Российской Федерации в 2017 г. было произведено 274,5 млн м³ ТКО, что на 30% больше, чем в 2007 г. [12]. Прирост во многом обеспечивался за счет расширенного использования бумаги, картона и полимеров в упаковке. По экспертным оценкам, под размещение отходов в нашей стране занято от 40 до 70 тыс. км², что сопоставимо с территорией ряда европейских стран [16]. По оценкам Росприроднадзора России [11], ежегодный прирост занятой отходами территории составляет около 400 тыс. га, и при сохранении этой динамики к 2050 г. 1% площади России будет приходиться на свалки. Учитывая также, что объем накопленных на территории нашей страны отходов, по некоторым оценкам, составляет 100 млрд т [28], проблема обращения с ТКО признается сегодня одной из наиболее социально и экологически значимых.

Обращение с отходами рассматривается сегодня не только как ключевая область глобальной защиты окружающей среды, но и как важный элемент в системе устойчивого развития, связующее звено между производством, рынком, потребителем товаров и услуг, с одной стороны, и состоянием почвы, воздуха, грунтовых вод и климатом, с другой [34]. Поэтому общемировая стратегия обращения с ТКО реализуется в парадигме концепции устойчивого развития, сформулированной в виде 27 принципов в документе «Декларация Рио», принятом Конференцией ООН по окружающей среде и развитию в 1992 году в г. Рио-де-Жанейро [7], направленных на преодоление глобального экологического кризиса, то есть на достижение такого состояния взаимодействия между обществом, технологиями и природой, когда негативный

эффект антропогенного (техногенного) воздействия на биосферу будет уравниваться за счет процессов естественного самовосстановления природных экосистем при обеспечении устойчивых темпов экономического роста (то есть на уровне 2–3% в год) [3].

С точки зрения устойчивости, огромные объемы отходов, непрерывно и во все возрастающем количестве образующиеся в процессе жизнедеятельности человека, превращаются из нерешаемой проблемы в ценный материальный ресурс, но только в случае активного и заинтересованного вовлечения в процессы сбора и полезной утилизации ТКО всех членов общества. Как следствие, идеология практического управления ТКО в технологически развитых странах строится на двух базовых принципах: сокращении образования и накопления отходов как приоритетной цели, наряду с экологически безопасной утилизацией и максимальным вовлечением ТКО в хозяйственный оборот в качестве ценного вторичного сырьевого ресурса. Этот подход в полной мере соответствует концепции циркулярной экономики (или экономики замкнутого цикла), представляющей собой базовую основу биоэкономики как новой, устойчивой системы хозяйства, построенной на безотходных замкнутых технологических процессах. В системе обращения с ТКО это находит свое воплощение в реализации принципа 3R (Reduce — предотвращение образования; Reuse — повторное использование; Recycle — переработка во вторичное сырье). Следовательно, устойчивая и эффективная система обращения с отходами должна опираться на сеть объектов инфраструктуры, созданных с учетом местных географических, климатических, демографических и социально-экономических особенностей и функционирующих с использованием современных высокоэкологических технологий переработки ТКО замкнутого цикла. Комплексный характер задач, возникающих в данной парадигме, требует междисциплинарных исследований, технологических и технических решений для достижения необходимого баланса между урегулированием социально-экономических проблем, обеспечением высокого качества жизни нынешнего и будущих поколений, сохранением окружающей среды и смягчением последствий изменения климата на планете [36].

Как известно, важнейшей целью по сдерживанию глобального потепления признано достижение стабилизации выбросов парниковых газов (ПГ) и CO₂, что предусмотрено принятым в 2015 г. Парижским соглашением (The Paris Agreement), к которому в 2019 г. присоединилась и Российская Федерация [21]. Соглашение преследует цель удержания среднемировой температуры на уровне 1,5 °C относительно доиндустриального показателя, не допуская роста свыше 2 °C, поскольку это с большой вероятностью

вызовет сдвиг компонентов климатической системы Земли вплоть до превышения критических пороговых значений. Для исключения возможного апокалиптического сценария необходимо сокращение антропогенного воздействия на биосферу, что будет обеспечиваться определенными обязательствами стран Парижского соглашения по снижению образования ПГ, принятыми на национальном уровне. Однако, по мнению ряда экспертов, суммарный объем уже принятых странами добровольных обязательств выглядит недостаточным и не обеспечивает максимального ограничения роста температуры ниже 3 °С. В связи с этим возникает потребность в применении новейших технологий и передовых экологических практик для максимального сокращения всех возможных источников эмиссии ПГ и CO₂, одним из крупнейших среди которых являются отходы, хранящиеся на полигонах и свалках [5].

В настоящее время 88% из 19,2 млн т загрязнений, ежегодно выбрасываемых в атмосферу, не подвергаются предварительной очистке [1]. В соответствии с экспертными оценками, соблюдение Российской Федерацией Парижского соглашения (в рамках Соглашения Россия намерена сократить выбросы CO₂ до уровня не выше 70% относительно 1991 года) [33] будет во многом определяться масштабом использования возобновляемых источников энергии (ВИЭ), включая ТКО. В научной литературе нет единодушия в квалификации ТКО как возобновляемого источника энергии, но поскольку ТКО на практике действительно являются постоянно возобновляемым ресурсом и содержат высокую долю материалов, которые могут использоваться для энергетической генерации, авторы считают правомерным отнести ТКО к категории ВИЭ [19]. Ситуация, сложившаяся к настоящему времени в России в сфере управления отходами, не позволяет обеспечить достижение данного показателя вследствие крайне слабого развития инфраструктуры обращения с ТКО.

Как следует из статистики, опубликованной Росприроднадзором России [16], из общего количества объектов обращения с ТКО (3921 объект) 8% приходится на объекты обработки, 5% — на объекты обезвреживания и 3% — на объекты утилизации отходов; долю 26% составляют полигоны, включенные в ГРОРО (Государственный реестр объектов размещения отходов), а 58% (2275 объектов) занято свалками, используемыми для захоронения ТКО. То есть в составе имеющейся инфраструктуры только 16% объектов способны осуществлять полезную утилизацию отходов: либо рециклинг (повторное использование отходов для производства товаров), регенерацию (возврат товаров в производственный цикл после

необходимой подготовки) и рекуперацию (извлечение из отходов полезных компонентов для их повторного применения), либо обезвреживание путем уменьшения массы и изменения состава, физических и химических свойств отходов за счет применения различных методов обработки.

По данным отчета Счетной палаты Российской Федерации, при сложившихся темпах роста объемов образования ТКО существующие мощности полигонов в 32 субъектах Российской Федерации будут исчерпаны до 2024 года, а в 17 — до 2022 года. Дефицит мощности полигонов в этих регионах составляет от 120 тыс. т до 1 млн 365 тыс. т в год. Есть также регионы, где доступные ресурсы уже исчерпаны, при этом возможностей создать новые полигоны у большинства регионов нет [14]. Такая ситуация приводит к существенному увеличению расстояний транспортировки отходов на действующие полигоны, росту тарифов на вывоз мусора для населения и хозяйствующих субъектов и, как следствие, к увеличению числа несанкционированных свалок. Все это обуславливает рост социальной напряженности, дальнейшее ухудшение санитарно-гигиенического состояния населенных пунктов и экологической ситуации в регионах (См. доклад Общественной палаты РФ, 2018 [8]).

Помимо неразвитости инфраструктуры мусороперерабатывающих заводов в России (в России действуют всего 243 мусороперерабатывающих и 50 мусоросортировочных комплексов, а также 10 мусоросжигательных заводов), к основным препятствиям для построения современной системы обращения с ТКО следует отнести неудовлетворительную обеспеченность отрасли инновационными технико-технологическими решениями, экологически и экономически эффективными технологиями, а также слабую интеграцию методов раздельного сбора мусора, наряду с низкой экологической культурой и недостаточной вовлеченностью населения в создание устойчивой системы обращения с отходами.

Для комплексного решения проблемы ТКО в нашей стране, обеспечивающего высокий уровень полезной переработки отходов, сокращение их образования и накопления, необходимо наличие ряда ключевых компонентов в составе единой цепочки разноплановой деятельности по обращению с ТКО, начиная с создания и внедрения передовых отечественных технологий замкнутого цикла для полезной утилизации разнородных по составу (смешанных) отходов и заканчивая развитием рынков для продуктов их переработки.

Как следует из зарубежного опыта, задача предотвращения роста объемов ТКО требует также разработки и применения современных методов прогнозирования

потоков отходов на долгосрочную перспективу. По литературным данным, в отечественной практике опыт долгосрочного прогнозирования объемов образования отходов практически отсутствует [1]. В то же время, по экспертным оценкам, целевые индикаторы, указанные в «Стратегии развития промышленности по обработке, утилизации и обезвреживанию отходов производства и потребления на период до 2030 года» [24], способны обеспечить только сокращение темпов прироста накопленных отходов с 6,8% в 2018 г. до 2,6% в 2024 г., но не смогут прекратить рост накопления отходов [6]. Необходимость уточнения индикативных показателей и формулирования реалистичных задач и ориентиров развития отрасли на всех организационных и управленческих уровнях обуславливает актуальность разработки и широкого использования отечественных технологий и инструментов моделирования процессов функционирования системы обращения с ТКО и прогнозирования результатов. Необходимым условием выработки эффективной политики в отношении сокращения влияния отходов на экологию и здоровье населения является создание единой информационной базы в сфере обращения с ТКО. Решение этой задачи предполагает разработку и использование геоинформационных технологий. С помощью функционала географических информационных систем (ГИС), например, возможны построение цифровых моделей, визуализация и анализ потоков ТКО, учет территориального распределения объектов размещения и утилизации отходов, оценка их локализации относительно населенных пунктов и природно-техногенных систем. Применение инструментария ГИС обеспечит полную информацию о предприятиях по переработке отходов, включая данные о мощности и технологическом оборудовании, сведения о технологиях и процессах переработки, видах перерабатываемых отходов и источниках их поступления, о получаемых в результате переработки продуктах и путях их реализации и др. [18].

Как справедливо отмечено в Докладе Общественной палаты Российской Федерации «проблема цивилизованной утилизации отходов потребления может быть решена только при постоянном открытом и конструктивном диалоге органов власти с населением, неукоснительном соблюдении требований законодательства и обеспечении прав граждан на охрану здоровья и благоприятную окружающую среду» [8]. Из этого следует, что важнейшую интегральную часть устойчивого обращения с ТКО должен составить социогуманитарный блок, определяющий основные цели, задачи и направления деятельности, связанные с созданием благоприятных социальных условий для формирования безопасной и эффективной системы обращения с ТКО с

учетом особенностей нашей страны (большая территория, различия в уровне социально-экономического развития регионов, удаленность многих мелких населенных пунктов от объектов централизованного снабжения и т.д.).

Задачи, сформулированные в «Стратегии развития промышленности по обработке, утилизации и обезвреживанию отходов производства и потребления на период до 2030 года» [24] и в «Основах государственной политики в области экологического развития Российской Федерации на период до 2030 года» (утв. Президентом РФ 30 апреля 2012 г.), определяют приоритет ресурсосбережения при опоре на формирование и опережающее развитие промышленности по обработке, утилизации и минимизации количества отходов, не подлежащих дальнейшей утилизации, с применением упомянутого выше принципа 3R. Основные усилия государство предполагает направить на максимально полное вовлечение отходов в производственный оборот, а также на обеспечение новой отрасли современным высокотехнологичным оборудованием. В соответствии с установленными цифровыми индикаторами развития отрасли планируется, что в 2016–2030 гг. произойдет снижение объема образования отходов производства и потребления на 8,8%, а уровень зависимости от импортного оборудования снизится до 10%. Соответствующий сегмент машиностроения в настоящее время является крайне импортозависимым и, в случае достижения запланированных показателей, за 12 лет будет не только создана отрасль по обращению с отходами на территории Российской Федерации, но и сформирован задел для экспортной конкурентоспособности в этой области. В дополнение к этому в 2018 г. в рамках национального проекта «Экология» был взят курс на создание экономики замкнутого цикла в сфере обращения с ТКО, что, как ожидается, поспособствует достижению целей программы «Комплексная система обращения с твердыми коммунальными отходами» проекта «Экология»: увеличение к 2024 г. доли обрабатываемого мусора с 12 до 60%, перерабатываемого — с 7 до 36%, а также введение в эксплуатацию объектов по обработке отходов общей мощностью 37,1 млн тонн. Однако, по некоторым оценкам [31], практические задачи перехода к экономике замкнутого цикла в России в сфере управления ТКО должны решаться в плоскости повышения уровня повторного использования отходов до 70% и упаковки до 80%, а также путем использования экологически безопасных технологий полезной переработки отходов и запрета на захоронение любых перерабатываемых и биоразлагаемых отходов на полигонах.

Таким образом, в России, в целом, сложилось понимание преимуществ циркулярной экономики, в том

числе для устойчивого функционирования системы обращения с ТКО, однако, как следует из анализа литературных источников, до настоящего времени отсутствуют апробированные методики выбора оптимальной модели оценки эффективности технологий в зависимости от местных региональных условий, максимально обеспечивающих потребности экономики замкнутого цикла и обладающих потенциалом повышения вовлеченности гражданского общества в экологически ответственную деятельность за счет комплексного использования социогуманитарных технологий. Следовательно, создание системы обращения с ТКО становится не только технико-технологической и экологической проблемой, но и, в не меньшей степени, — социальной и политической. Сопряжение в сегменте обращения с ТКО решения задач инновационного технологического развития с задачами социогуманитарного блока позволяет расширить спектр инструментов и методов за счет междисциплинарных взаимодействий и приблизить реализацию целей снижения потока отходов и повышения эффективности их полезной переработки при достижении высокого уровня доверия со стороны общества к управлению, деловой практике и технической эксплуатации производственных объектов. Данный подход может быть назван «интегрированной замкнутой системой устойчивого, социально ориентированного управления ресурсами и отходами». Внедрение в практику такой модели управления ТКО положит начало наработке ценного опыта по организации и администрированию сложных социально-экономических и производственных процессов на принципах циркулярной экономики (биоэкономики).

Морфологический состав ТКО и способы их переработки

Динамика образования и состав ТКО различаются по странам мира в зависимости от социально-экономического уровня, потребительских предпочтений, культурных и национальных особенностей. Так, например, в Испании преобладающим компонентом в составе ТКО являются пищевые отходы, в США, Великобритании, Канаде и Японии на первом месте — бумага, к лидирующим позициям стремятся полимерные отходы. В России на пищевые отходы приходится до 35–45% объема ТКО, около 32–35% составляют бумага и картон, 2–3% — стекло [3].

Сложность обращения с ТКО в значительной мере зависит от смешанного характера данного вида отходов, включающих в себя как разнообразные биологические (органические), так и неорганические фракции. В среднем доля органических компонентов в составе ТКО достигает 50–60%. Некоторые из неорганических компонентов,

например, металл, пластик, керамика, пригодны для вторичной переработки или повторного использования, а пищевые отходы могут быть подвергнуты биологическому разложению, например, компостированию. В то же время значительная часть органических отходов (около 30% от объема ТКО) не подлежит переработке. Высокое содержание горючих компонентов в органической части таких отходов в виде резины, бумаги, шлаков, древесины и т. д., делает возможным их использование в качестве источника энергии, что обеспечивает одновременное решение двух острейших проблем: утилизации отходов и получения энергии [2, 36].

Стратегия создания устойчивой системы обращения с отходами, позволяющей не просто избавляться от них, но использовать как стратегический ресурс для извлечения тепла, электричества и представляющих ценность материалов, сегодня успешно реализуется, например, в Японии, где доля переработки отходов с получением полезных продуктов близка к 100%. В Евросоюзе рециклингу и компостированию подвергаются в среднем 47% ТКО (2018) [33], хотя в отдельных европейских странах доля ТКО, вовлеченных в переработку, достигает 80–87%, а сортировка отходов прочно вошла в жизнь большинства граждан [4, 13].

Показатель уровня переработки ТКО в Российской Федерации, по данным Министерства природных ресурсов Российской Федерации, составляет всего 8% [20]. Остальной объем идет на полигоны и свалки. Если в странах Евросоюза с применением сжигания в настоящее время утилизируется около 25% объема образующихся горючих отходов, то в России этот показатель составляет всего около 2,3% [2].

Структурный состав ТКО определяет особенности функционирования системы обращения с отходами, требования к процессам сбора и сортировки, а также оптимальные способы обработки и утилизации [22]. К основным методам обращения с ТКО после извлечения из них полезных фракций (стекло, металл, алюминий и др.) относятся [29]:

- захоронение на полигонах;
- сжигание и различные термохимические процессы;
- анаэробное сбраживание фракций органических отходов;
- компостирование органической части отходов;
- предотвращение образования и минимизация количества отходов.

Каждый из указанных способов управления отходами обеспечен соответствующими технологиями и методами, имеет свои особенности, достоинства и недостатки.

Обзор технологий для устойчивой системы обращения с ТКО

Сегодня известно свыше 30 технологий обезвреживания и утилизации ТКО, по некоторым из них существует до 50 разновидностей. Основные технологии, используемые для управления ТКО, представлены на рисунке 1. С экономической точки зрения, по имеющимся данным, если расположить методы переработки ТКО по степени возрастания стоимости, последовательность будет выглядеть следующим образом (представлены данные на примере США [28]: захоронение на полигоне (2,57 долл. США/тонна) – пиролиз ТКО (5,42 долл. США/тонна) – компостирование (6,28 долл. США/тонна) – сжигание на мусоросжигательных заводах (МСЗ)

(8,97 долл. США/тонна). Самым дешевым и поэтому наиболее широко применимым способом удаления отходов является захоронение на полигонах, при этом современная инфраструктура такого метода в развитых странах обеспечивается экологической защитой (системами фильтрации, сбором биогаза и др.), в то же время данный способ управления отходами не может обеспечить их полноценное вовлечение в хозяйственный оборот, что противоречит концепции устойчивости. В России, как было отмечено выше, на полигоны и свалки отправляется свыше 90% ТКО и лишь 1% из общего количества полигонов оборудован современными устройствами, предотвращающими контакт отходов с окружающей средой [28].

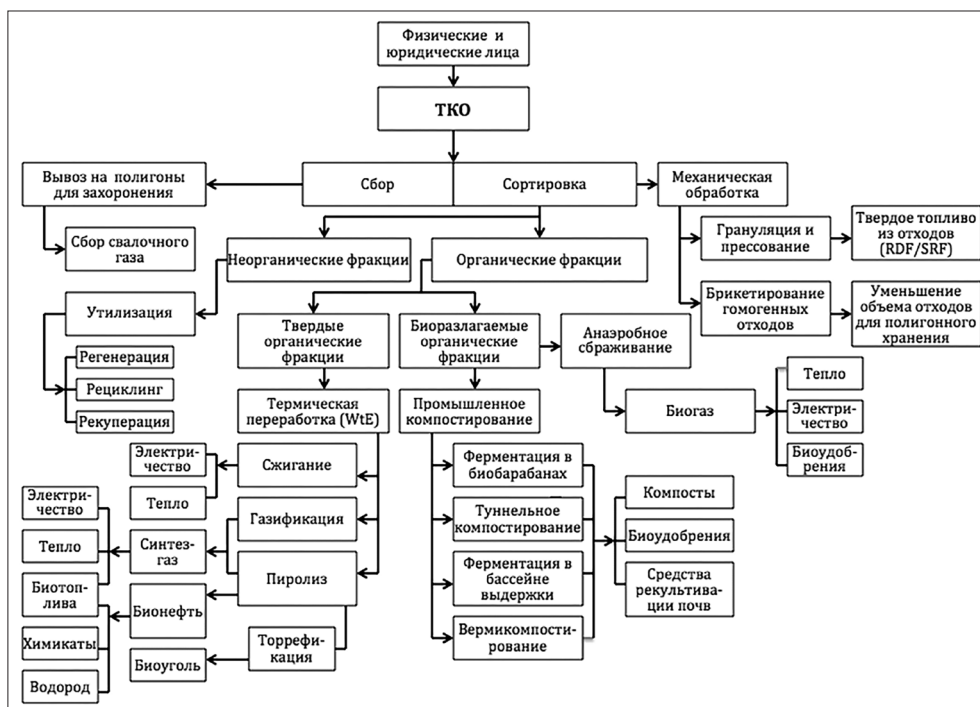


Рис. 1. Место и роль современных технологий в системе обращения с твердыми коммунальными отходами

К известным экологически безопасным и широко практикуемым за рубежом способам управления отходами относятся технологии промышленного компостирования биологически разлагаемой органической фракции ТКО. Эти технологии основаны на естественных процессах, характерных для природной среды, и не несут экологической угрозы. Применением методов ускоренного промышленного компостирования, включая технологии вермикомпостирования, обеспечивается максимально полное и эффективное использование ТКО в качестве полезного ресурса с получением биоорганических удобрений, востребованных в сельском, лесном, коммунальном и фермерском хозяйстве, в садоводстве

и огородничестве, а также находящихся все большее применение среди предприятий, связанных с органическим и биодинамическим сельским хозяйством, практикующих инновационные методы повышения плодородия почв, роста урожайности основных сельскохозяйственных и технических культур, а также для борьбы с деградацией почв и для технической рекультивации земель с нанесенным экологическим ущербом. Централизованные промышленные компостирующие заводы способны обрабатывать более 100 тыс. тонн биоразлагаемых отходов в год, но, как правило, размер завода составляет от 10 тыс. до 30 тыс. тонн в год [9]. В Российской Федерации, в отличие от зарубежных практик, технологии

компостирования в промышленном масштабе пока не нашли широкого применения. Для сравнения: в США при ежегодном объеме ТКО 230 млн. т (в среднем 760 кг на человека) перерабатывается около 30%, в том числе и путем компостирования, 15% — сжигается, 55% — подлежит захоронению на полигонах. Некоторое развитие получили весьма перспективные технологии анаэробного сбраживания в биореакторах органических отходов высокой влажности и иловых остатков сточных вод с получением биогаза и побочного продукта, который может использоваться в качестве биоудобрения. Биогаз может применяться как замена ископаемого топлива для производства тепла и электроэнергии, а также в качестве газомоторного топлива. За рубежом в наибольшей степени такие технологии используются в Германии, США, Японии, Швеции, Бельгии, Франции и др. [10].

Поскольку значительная часть ТКО представлена твердыми органическими отходами, по мнению специалистов, наиболее эффективным и целесообразным методом утилизации этих фракций является термическая переработка [2]. Теплотворная способность ТКО может достигать 7500–8400 кДж/кг, что соответствует показателям бурого угля и других низкосортных видов топлива. Высокая теплотворная способность ТКО объясняет широкое распространение в мире технологий сжигания, которые, наряду с другими практиками термической обработки, объединяются по характеру процесса в группу технологий под названием «энергия из отходов» — WtE (от англ. «waste-to-energy»). Масштабное использование современных технологий термической переработки на принципах энергогенерации позволяет рассчитывать на существенное сокращение эмиссии ПГ, что окажет положительное воздействие на глобальные экологические и климатические процессы и одновременно будет влиять на дальнейшее изменение характера мировых энергетических систем, способствуя развитию автономного децентрализованного энергоснабжения.

Термическая переработка отходов охватывает большую группу технологий, которые можно условно разделить на 3 вида по типу инсинерации: прямое сжигание (при температурах свыше 1000 °С), газификация (сжигание при температурах 800–1300 °С в присутствии воздуха или кислорода и водяного пара) и пиролиз (переработка сырья без доступа воздуха при температурах 300–800 °С). Однако при всем разнообразии подходов до настоящего времени не найдено идеального решения для технически выполнимой, экологически безопасной и одновременно экономически выгодной переработки смешанных отходов [28].

Несмотря на то, что наиболее известные и распространенные технологии сжигания, применяемые на

МСЭ, обеспечивают надежное обезвреживание отходов и сокращают их объем приблизительно в 10 раз, а массу — в 3 раза, их значительные недостатки привели к тому, что, в частности, в США с 1995 г. введен запрет на строительство новых МСЭ. Количество действующих МСЭ уже к 2010 г. было сокращено в 2 раза и в настоящее время продолжает сокращаться. В сообщении Европейской комиссии о роли процесса преобразования отходов в энергию в циркулярной экономике также предлагается запретить на территории стран ЕС строительство новых МСЭ и вывести из эксплуатации старые и неэффективные объекты. Достаточно высокие экологические риски обуславливают повсеместные выступления граждан против размещения в непосредственной близости от населенных пунктов не только объектов по захоронению отходов, но и против реализации проектов по строительству МСЭ [8, 32]. Это недоверие со стороны общества автоматически распространяется и на проекты, сориентированные на применение других, более экологически безопасных технологий, что во многом объясняется недостаточным вниманием к эколого-технологическим и социальным аспектам при решении проблемы обращения с отходами, слабой информированностью населения, отсутствием должного доверия к управленческим структурам отрасли.

Изменение устоявшихся поведенческих моделей населения по отношению к объектам обращения с ТКО возможно за счет государственной поддержки разработки и внедрения новых, экономически выгодных и экологически безопасных технологий переработки отходов и одновременно — путем усиления целенаправленной образовательной и просветительской деятельности, развития информационных, социальных и сетевых коммуникаций, разъяснительной работы с общественным мнением относительно преимуществ, которые обеспечиваются экологически ответственным поведением и применением передовых технологий переработки ТКО. Несколько противоречит такому пониманию тот факт, что в Российской Федерации в рамках приоритетного проекта «Чистая страна», предусмотренного Государственной программой «Охрана окружающей среды» на 2012–2020 годы, акцент делается на снижение первоочередных экологических рисков (включая ликвидацию незаконных свалок и части полигонов) и снижение объемов захоронения ТКО в основном за счет строительства МСЭ (в том числе с выработкой электроэнергии), а другие способы термической переработки отходов (газификация, пиролиз) не учитываются, в то время как они являются более экологически безопасными, менее затратными и обеспечивают более широкие возможности полезного использования образующейся теплоты сгорания

не только в качестве возобновляемого источника энергии, но и для получения востребованных на рынке биотопливных продуктов. Приоритет сжигания ТКО перед другими способами термической обработки поддерживается также изменениями, внесенными в Федеральный закон № 89-ФЗ [26], в соответствии с которыми только этот метод термической переработки отходов с получением энергии переведен из способов обезвреживания ТКО в категорию утилизации с соответствующим снижением законодательных требований к таким объектам и возможностью использования мер государственной поддержки, действующих для технологий сжигания отходов в качестве возобновляемого источника энергии. Для объектов обезвреживания ТКО требуется больше экологической документации и разрешений, чем для объектов утилизации; они подлежат государственной экологической экспертизе (ГЭЭ), проверяются на соответствие экологическому законодательству, в ходе проверки должно подтверждаться отсутствие негативного влияния на окружающую среду. Для проектов по утилизации ТКО необходимо разработать только технические условия на продукцию. Конкурентные экологически более безопасные и экономически более рентабельные технологии газификации и пиролиза отходов, таким образом, оказались в менее выгодном положении, что препятствует их внедрению.

Для максимального использования полезного ресурса ТКО современные технологии энергетической переработки отходов целесообразно использовать в комплексе с промышленным компостированием в виде локальных утилизационных объектов (комплексов) для городских микрорайонов или небольших поселений, которые смогут обеспечить генерацию тепловой и электрической энергии для населенного пункта и утилизацию ТКО непосредственно по месту их образования. Это, в свою очередь, позволит получить существенный экономический эффект как за счет сокращения объемов вывоза ТКО, так и за счет получения энергии из бросового сырья, вместо привозного топлива. Внедрение подобного комплекса в непосредственной близости от жилой застройки повысит социальную ответственность граждан при сортировке отходов и сборе фракций, представляющих интерес с точки зрения возможности их повторного использования (бумага, стекло, металл, пластик и др.) или для получения на их основе полезных продуктов (энергия, компосты, биоудобрения и др.), имеющих растущий спрос, особенно в аграрных регионах. Использование этих технологий в системе обращения с ТКО позволило бы удовлетворить первоочередные потребности государства и населения не только в улучшении

экологической ситуации и здоровья населения, но и в развитии территорий, росте экономики в регионах, формировании системы децентрализованного автономного энергообеспечения, повышении качества жизни, в том числе в малонаселенных сельских территориях, а также в северных и арктических регионах.

Перспективы развития технологий обращения с ТКО

Как следует из анализа научных источников, дальнейшее развитие технологий переработки отходов идет в следующих направлениях:

- снижение производственных и эксплуатационных расходов и повышение рентабельности технологических процессов;
- повышение гибкости в применении технологий: возможность реализации технологий как при малых, так и при больших потоках ТКО;
- расширение спектра перерабатываемых компонентов в составе отходов;
- повышение экологической безопасности технологических процессов.

Судя по последним данным о состоянии текущих исследований в этой области [28, 29, 36], разработчикам удается пока добиться незначительного прогресса лишь по отдельным показателям, что совершенствует технологии, но не открывает принципиально новых возможностей в их развитии. Прорывной характер могли бы иметь разработки в таких областях научных исследований, как, например, плазменные технологии переработки ТКО или использование модифицированных микроорганизмов, способных осуществлять высокоэффективную биоконверсию отходов благодаря применению современных методов синтетической биологии. Однако эти передовые технологии еще далеки от широкого применения. Например, плазменная технология практически идеальна для утилизации отходов с точки зрения высокой экологической безопасности и возможности утилизации любых смешанных отходов без предварительной сортировки и обработки, но препятствием для использования служит низкая практическая доступность данной технологии, которая существует пока только в единичных разработках, а также ряд технических ограничений, характерных для процесса плазменной утилизации отходов. Еще на более ранних стадиях развития находятся технологии, связанные с использованием инструментария синтетической биологии.

Перспективность комплексного подхода к решению задачи переработки отходов подтверждается возрастающим интересом к нему со стороны зарубежных разработчиков новых технологий. Высокой эффективностью

отличается, например, комбинированная технология переработки смешанных отходов ArrowBio (Израиль), направленная на извлечение вторичного сырья из ТКО с дальнейшим производством энергии, то есть представляющая собой рециклинг несортированных отходов механическими и биологическими системами. Процесс включает в себя предварительное гидроразделение отходов с выделением крупных твердых элементов (которые отправляются на второй цикл утилизации или на полигон) и органической взвеси, которая направляется в биореактор (с получением биогаза, удобрений и воды) или на компостирование.

Хорошие перспективы развития имеют технологии термохимической конверсии в целом и пиролитической переработки, в частности, как обладающие высоким потенциалом решения экологических и социально-экономических проблем. Научные исследования и разработки, осуществляемые в настоящее время в России и в мире в данной области, направлены, главным образом, на совершенствование процесса конверсии, включая:

- оптимизацию условий протекания технологического процесса;
- улучшение конструкции реактора;
- совершенствование автоматического управления путем компьютеризации.

В зависимости от вида сырья и условий протекания процесса конечные продукты пиролиза могут быть твердыми (биоуголь), жидкими (бионефть), газообразными (синтез-газ). В процессе пиролиза не происходит восстановления тяжелых металлов, а образующийся небольшой твердый непиролизуемый остаток в виде шлака подлежит захоронению, но не вредит при этом природной среде, так как не содержит биологически активных веществ. Кроме отсутствия вредного воздействия на окружающую среду, безусловным преимуществом пиролиза является и возможность перерабатывать такие трудно поддающиеся утилизации компоненты отходов, как пластмассы, резиновые покрышки, отработанные масла и др. К недостаткам пиролиза относится, как правило, небольшая мощность пиролитических установок по переработке отходов. Один из путей преодоления этого лимитирующего фактора — усовершенствование конструкции реактора, где осуществляется процесс пиролиза. Так, например, использование керамической печи Stone & Webster (США) повышает объемы переработки за счет высокой температуры и отсутствия коксования, а технические усовершенствования печи SRT-X компании ABB Lummus Global (США) позволили выйти на мощность установки до 1,4 млн т/год. Увеличение мощности пиролитической установки может также достигаться в случае модульного характера

технологического оборудования, что позволяет наращивать мощность по мере необходимости. Следует отметить, что в силу того, что наиболее производительными являются установки для пиролиза моносырья (например, автомобильных шин, древесных отходов или навоза), технологии пиролитической переработки таких смешанных отходов, как ТКО, пока не получили широкого распространения, хотя, например, в технологически развитой Японии метод пиролиза уже нашел применение почти на 100 объектах по энергетической утилизации ТКО.

Для преодоления ограничений технологии, связанных с необходимостью снижения капитальных и операционных затрат, используются различные модификации технологического процесса. Наибольшую известность на мировом рынке получили технологии пиролиза, представленные такими компаниями, как Technip (Франция), ABB Lummus Global (США), Linde (Германия), Kellogg Brown & Root (США), Stone & Webster (США). Для промышленного пиролиза наиболее отработана технология SBV концерна Siemens KWU (Германия), включающая в себя пиролиз отходов и последующее высокотемпературное сжигание его продуктов (1300 °С) с жидким шламоудалением.

Специфика ТКО, связанная с их разнородным многокомпонентным составом, заставляет вести усовершенствование технологии в направлении большей гибкости относительно спектра перерабатываемых материалов. Так, научно-производственной фирмой «Термоэкология» акционерного общества «ВНИИЭТО» (Москва) предложена комбинированная технология, направленная на переработку шлаковых и зольных отвалов ТЭЦ с добавлением части отходов ТКО. А для переработки смешанного бытового мусора (пищевых отходов, бумаги, древесины и др.) в Объединенном институте высоких температур РАН (Москва) разработана инновационная технология гидротермальной карбонизации при температуре 240–280 °С с получением биоугля.

В зависимости от предпочтений по виду целевого продукта, а также для достижения максимально возможных объемов его выхода используют такие методы оптимизации процесса пиролиза, как предварительная подготовка сырья (сушка, фракционирование и др.), подбор наиболее оптимальных температурных режимов (в более низком диапазоне — для бионефти и в более высоком — для синтез-газа), скорость прохождения реакции (медленный, быстрый, ультрабыстрый, мгновенный пиролиз и др.), условия прохождения реакции (время нагрева, давление, перемешивание биомассы, применение различных иницирующих добавок, водорода, жидких, газообразных и твердых теплоносителей и др.).

Актуальным способом интенсификации термохимических процессов является применение гетерогенных катализаторов. Например, Nalco Exxon Energy Chemicals (США) разработаны новые ингибиторы коксообразования при пиролизе, в основе которых — фосфорорганические соединения. Их использование увеличивает период эксплуатации пиролизической установки в два раза. Используются и другие добавки, влияющие на эффективность конверсии и показатели экологичности процесса: галогены, органические пероксиды, пропадиен, метилацетилен и др. Интересные результаты показало, например, использование смеси из 4–6 неорганических солей, способствующей лучшим показателям процесса конверсии и получению более чистых продуктов на выходе.

В ФИЦ «Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН» (Новосибирск) разработана актуальная технология термической утилизации иловых остатков сточных вод в кипящем слое с применением катализатора, благодаря чему обеспечивается более низкая температура сжигания и значительно уменьшается содержание вредных выбросов. При этом расход катализатора составляет полпроцента в сутки, уровень утилизации осадков достигает 90%, образующийся твердый остаток в виде золы экологически безопасен. По ряду параметров данная отечественная технология превосходит зарубежные аналоги.

Задачу улучшения экономических показателей пиролиза разработчики технологий решают также за счет расширения спектра и функционала продуктов, получаемых в результате переработки отходов. Например, по отечественной безотходной технологии «Экуот» (экологический комплекс утилизации отходов) пиролизу предшествует измельчение и сушка отходов, а после пиролизической деструкции материала выполняется конденсация парогазовой смеси в жидкое топливо. Пиролизный газ, оставшийся после конденсации, направляется в когенерационную установку для выработки тепла и электричества, а жидкая фракция после крекинга конвертируется в печное топливо, биодизельное топливо, биобензин и биокеросин. Даже углистый остаток, образующийся по окончании технологического процесса, перерабатывается в топливные брикеты. Однако при всех преимуществах подхода он не исключает риска образования супертоксикантов в зависимости от состава перерабатываемых отходов.

Примером еще одного подхода к термической утилизации отходов может служить процесс дуплексной переработки по технологии ООО «Гринэнерго» (Москва). Она является безотходной и включает в себя применение двух методов термохимической конверсии: пиролиза и газификации. На начальной стадии процесса требуется

произвести измельчение и сушку отходов, а на выходе получают не только твердое, газообразное и жидкое моторное топливо, но также удобрения и стройматериалы.

По мнению специалистов [15, 22], на перспективу значительный интерес для внедрения представляет высокотемпературный пиролиз, протекающий при температурах 900–1050 °С с минимальным выходом жидких и твердых остатков и максимальным объемом вырабатываемого газа с минимальным значением теплоты сгорания. Предпочтения отдаются также двухстадийному пиролизу, обеспечивающему максимально безопасную и полную деструкцию отходов с получением востребованных на рынке продуктов переработки и улучшающих, таким образом, экономические показатели процесса конверсии в целом.

Экологически чистая технология высокотемпературной переработки ТКО разработана, в частности, в НПП «Сибэкотерм» (Новосибирск), технология двухстадийного высокотемпературного пиролиза отходов — в Объединенном институте высоких температур РАН (Москва) и др. Пиролизические методы переработки для использования в мобильных установках, предназначенных для небольших объемов отходов, разработаны в Тверском государственном университете и Донском государственном техническом университете (Ростов-на-Дону).

Считающиеся полностью экологически безопасными технологии плазменной газификации находятся на разных стадиях развития. Они основаны на использовании более высоких температур, чем при сжигании и пиролизе (до нескольких тысяч градусов Цельсия и не ниже 1800 °С), с получением на выходе синтез-газа и неперерабатываемого стекловидного шлака (Plasma Energy Corporation, Гонконг; Westinghouse Plasma Corp., США; High Temperature Technologies Corp., Канада и др.). К ограничениям метода, преодолением которых сегодня занимаются разработчики, следует отнести короткий срок эксплуатации плазмотрона (несколько сот часов работы в зависимости от особенностей технологического процесса, типа плазмотрона и вида плазмообразующего газа) и высокие экономические показатели процесса за счет больших энергозатрат и эксплуатационных расходов (2–3 кВт на 1 кг отходов без учета амортизации и стоимости сервисного обслуживания технически сложной установки), что характерно и для зарубежных, и для российских разработок. Активные исследования и разработки в области плазменной газификации ведутся в Институте электрификации и электроэнергетики РАН (Москва). В Институте теплофизики им. С.С. Кутателадзе СО РАН (Новосибирск) создана электропечь для плазменной переработки твердых отходов. В НИЦ «Курчатовский институт» (Москва) разработан инновационный плаз-

менно-химический метод обработки отходов с участием катализатора в виде смеси соединений металлов, которые также извлекаются из отходов.

Первоочередные социально-экономические задачи, решение которых обеспечивается разработкой и внедрением технологий для устойчивой системы обращения с ТКО

Как следует из «Стратегии развития промышленности по обработке, утилизации и обезвреживанию отходов производства и потребления на период до 2030 г.» [24], построение устойчивой системы обращения с ТКО обеспечивается решением комплекса конкретных задач в направлении социально-экономического и экологического развития общества. Задачи формирования устойчивой системы обращения с ТКО обуславливают необходимость развития технологий социогуманитарной аналитики, экспертизы и прогнозирования в интересах стратегического планирования потоков ТКО и выработки методов управления в системе обращения с отходами. А потребность в повышении общественного доверия к сектору управления отходами делает неизбежным развитие социальной рекламы и информационных технологий для социальных коммуникаций.

Создание масштабируемой на региональном уровне, социально ориентированной, локально интегрируемой модели замкнутой системы устойчивого управления ресурсами и отходами на принципах циркулярной экономики с использованием новых технологий будет обеспечивать решение следующих первоочередных социально-экономических задач:

- рост валового регионального продукта как результат внедрения новых ресурсосберегающих технологий, влияющих на развитие сектора экологических услуг в сфере обращения с ТКО, увеличение доходной части региональных и местных бюджетов за счет расширения налогооблагаемой базы с появлением новых объектов инфраструктуры в сфере обращения с ТКО;
- снижение ущерба, наносимого переработанными коммунальными отходами здоровью человека и окружающей среде;
- сокращение площадей, занятых под размещение полигонов и свалок, высвобождение земель для осуществления деятельности в области сельского хозяйства, строительства и рекреационных целей;
- внедрение новых технологий экологически безопасной переработки ТКО будет способствовать решению амбициозной задачи, поставленной руководством страны: к 2024 г. повысить переработку ТКО до 36% (увеличив объемы практически в

4 раза), что одновременно обеспечит существенное повышение качества жизни населения, в том числе жителей сельских окраин и малонаселенных территорий, благодаря эффективной охране окружающей среды;

- внедрение рациональных стратегий и практик управления отходами за счет трансфера новейших отечественных технологий, технических решений и ноу-хау на принципах импортозамещения;
- использование ТКО в качестве локального возобновляемого источника энергии с использованием произведенного тепла и электроэнергии не только для нужд предприятия, но и для энергообеспечения местного населения;
- развитие аграрных и труднодоступных территорий в различных климатических, географических и демографических условиях за счет получения энергии для децентрализованного энергообеспечения и ряда востребованных продуктов для сельского хозяйства и рекультивации почв;
- применение разрабатываемых технологий в интересах энергообеспечения отдаленных территориально-административных образований (ОТАО), лишенных источников магистрального электро- и теплоснабжения и существующих только за счет сезонного завоза угля (20–25 млн т), дизельного топлива и топочного мазута (7–8 млн т), что позволит исключить хронический энергодефицит, снизить в десятки раз расходы на энергообеспечение, создать условия для стабильного социально-экономического развития ОТАО, препятствовать растущему оттоку из ОТАО работоспособного населения. В ОТАО, расположенных в основном на территориях Северного, Западно-Сибирского, Восточно-Сибирского, Дальневосточного экономических районов РФ, проживают, по разным оценкам, 18–22 млн человек, то есть 18–20% населения РФ; в 40 регионах РФ располагаются ОТАО, имеющие официальный статус «Северные и приравненные к ним территории» [17];
- развитие малого и среднего предпринимательства, в том числе на сельских территориях;
- формирование и развитие рынков вторичного сырья и продуктов переработки отходов;
- обеспечение новых рабочих мест;
- повышение общественного доверия и расширение вовлеченности населения в реализацию схем раздельного сбора, утилизации и минимизации образования и накопления отходов, в том числе за

счет наглядности экологической и социально-экономической эффективности применения комплекса новых технологий.

Заключение

1. Формирование интегрированной замкнутой системы устойчивого, социально ориентированного управления ресурсами и отходами в соответствии с концепцией биосферосовместимого развития требует применения междисциплинарного подхода в создании набора технологий для системы обращения с ТКО, имеющих высокий потенциал экологической безопасности, энерго- и ресурсосбережения с одновременным развитием экологического сознания населения и повышением роли общества в природоохранной деятельности.

2. Задача построения устойчивой системы обращения с ТКО на принципах циркулярной экономики требует создания эффективных, экологически безопасных отечественных технологий, включая, в первую очередь:

- технологии анаэробного сбраживания биоразлагаемой фракции ТКО с получением биогаза и ускоренного высокопроизводительного промышленного компостирования для больших, средних и малых потоков отходов, с возможностью адаптации к условиям различных регионов России и с получением биоорганических удобрений и средств для рекультивации почв, востребованных в сельском, лесном и коммунальном хозяйстве, при работах по благоустройству территорий и восстановлению нарушенных земель;
- технологии термохимической экологически безопасной и экономически эффективной переработки отходов, включая газификацию и пиролиз, обеспечивающих максимальное извлечение полезных фракций отходов, снижение количества отходов, подлежащих захоронению, и позволяющих конвертировать органическую составляющую ТКО в газообразное топливо (синтез-газ) и другие востребованные продукты на его основе;
- технологии и технологические решения по применению синтез-газа для генерации электроэнергии в газотурбинных или газопоршневых электроагрегатах, в качестве топлива в отопительных котлах или для химического синтеза компонентов жидких моторных биотоплив и авиационного биотоплива;
- технологии организации замкнутых производственных циклов.

3. Поскольку выбор тех или иных методов физической, биологической или термической обработки напрямую зависит от объемов и состава ТКО, а также динамики их образования в условиях конкретных территорий и населенных пунктов, высокую актуальность имеет задача развития технологий перспективного прогнозирования и моделирования потоков ТКО, формирующихся в локальных географических условиях. С использованием этих методов региональная (территориальная) схема переработки отходов может корректироваться в пользу более активного использования технологий определенного вида с учетом анализа имеющейся и перспективной инфраструктуры управления отходами, а также степени распространения в обществе модели экологически ответственного поведения. Методы стратегического планирования и прогнозирования в системе оборота ТКО с использованием инструментария ГИС позволят обеспечить управление на всех этапах технологической цепочки, минимизирующее негативное воздействие на окружающую среду, и снизить риски принятия неверных политических и хозяйственных решений, которые могут иметь неблагоприятные последствия для экономических, социальных, правовых и экологических аспектов развития населенного пункта, региона или государства в целом.

4. Управление отходами тесно связано с такими социальными аспектами, как образ жизни и экологически ответственное поведение граждан, структура потребления ресурсов, уровень занятости и доходов, образование и профессиональная подготовка, а также с другими демографическими, социально-экономическими и культурными факторами. Поэтому для построения устойчивой системы обращения с отходами требуется применение технологий социогуманитарного профиля, направленных на повышение уровня экологического образования и ответственности граждан, социальной и общественной активности населения в решении проблем экологической обустроенности и социального комфорта малых поселений, включая малонаселенные сельские территории, расположенные в отдаленных от центра российских регионах.

Работа выполнена в рамках тематического плана НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Агаханянц П.Ф. Прогнозирование объемов образования ТКО // Твердые бытовые отходы. — 2015. — № 12. — С. 20–23.

2. Венгерский А.Д., Бугаев В.В. Технология сжигания твердых бытовых отходов / Технические науки: традиции и инновации: Материалы III Междунар. науч. конф. (г. Казань, март 2018 г.). — Казань: Молодой ученый. — 2018. — С. 103–106. <https://moluch.ru/conf/tech/archive/287/13916/>.
3. Витковская С.Е. Твердые бытовые отходы: антропогенное звено биологического круговорота — СПб: АФИ, 2012. — 132 с.
4. Волкова А.В. Рынок утилизации отходов. — Национальный исследовательский университет. Высшая школа экономики, 2018. — 87 с.
5. Гаева Т.Н., Варакин А.Н., Гуляева Л.А., Ишутенко Д.И., Кулинич А.Л., Никульшин П.А., Пимерзин А.А., Василов Р.Г. Развитие технологий и перспективы внедрения авиационного биотоплива // Биотехнология. — 2020. — Т. 36. — № 5. — С. 13–30.
6. Гильмундинов В.М., Тагаева Т.О. Анализ и прогнозирование системы обращения с отходами в РФ / Экономическая политика России в межотраслевом и пространственном измерении: Материалы конференции ИМП РАН и ИЭОПП СО РАН по межотраслевому и региональному анализу и прогнозированию / Отв. ред. А.А. Широков, А.О. Баранов. — М.: Наука, 2019. — Т. 1. — С. 112–118.
7. Декларация Рио. Принята Конференцией ООН по окружающей среде и развитию в 1992 году в г. Рио-де-Жанейро.
8. Доклад «Анализ эффективности мер по обеспечению переработки твердых коммунальных отходов и предложения по обеспечению учета мнения граждан Российской Федерации при строительстве объектов, используемых для переработке указанных отходов». Общественная палата Российской Федерации. — М., 2018. — 173 с. <http://president-sovet.ru/presscenter/news/read/4962/>.
9. Интернет-ресурс: <https://www.ecomena.org/composting/>.
10. Интернет-ресурс <https://ztbo.ru/o-tbo/lit/texnologii-otxodov/anaerobnaya-fermentatsiya>; <https://www.solidwaste.ru/publ/view/581.html>.
11. Интернет-ресурс Росприроднадзора <https://www.rpn.gov.ru>.
12. Интернет-ресурс Федеральной службы государственной статистики <https://rosstat.gov.ru>.
13. Кульбачевский А. Проблемы обращения с отходами в Москве. — Доклад руководителя Департамента природопользования и охраны окружающей среды Москвы. — МГУ имени М.В. Ломоносова, 2018. http://www.chem.msu.ru/rus/ecology_2018/kulbalchevskii.pdf.
14. Мещерягина О. Счетная палата не нашла в мусорной реформе ничего хорошего. Эксперт, 29 сентября 2020 г. <https://expert.ru/2020/09/29/schetnaya-palata-nenashla-v-musornoj-reforme-nichego-horoshego/>.
15. Мишустин О.А., Желтобрюхов В.Ф., Грачева Н.В., Хантимирова С.Б. Обзор развития и применения технологий пиролиза для переработки отходов // Молодой ученый. — 2018. — № 45(231). — С. 42–44.
16. Отходы в России: мусор или ценный ресурс. Международная финансовая корпорация (IFC, Группа Всемирного банка) <http://biotech2030.ru/wp-content/uploads/2018/04/Othody-v-RF.pdf>.
17. Падалко О.В. Вторая жизнь ненужной биомассы // Независимая газета, 10.06.2014 г. — С. 61.
18. Петров С.А. Использование ГИС-технологий в процессе комплексного регулирования твердыми коммунальными отходами // Московский экономический журнал. — 2020. — № 2. — С. 77–82.
19. Порфирьев Б.Н., Широков А.А., Колпаков А.Ю. Стратегия низкоуглеродного развития: перспективы для экономики России // Мировая экономика и международные отношения. — 2020. — Т. 64. — № 9. — С. 15–25.
20. Приказ Министерства природных ресурсов и экологии РФ от 14 августа 2013 г. № 298 «Об утверждении комплексной стратегии обращения с твердыми коммунальными (бытовыми) отходами в РФ».
21. Рамочная конвенция ООН об изменении климата (United Nations Framework Convention on Climate Change), принятая в 1992 г.; См. также: Киотский протокол (Kyoto Protocol to the Framework Convention on Climate Change), принятый в 1997 г.; Дохинская поправка к Киотскому протоколу (Doha Amendment to the Kyoto Protocol), принятая в 2012 г.
22. Сравнительный анализ технологий переработки твердых коммунальных отходов и механизмов обеспечения окупаемости проектов по строительству объектов по переработке твердых коммунальных отходов с минимизацией перекрестного субсидирования для участников оптового рынка электроэнергии и мощности. — НП «Совет рынка». — М., 2019. — 366 с. http://www.bigpowernews.ru/photos/0/0_bcmRrcUGF07gVhPipCpMaeXiMO6RuKp1.pdf.
23. Стратегия научно-технического развития Российской Федерации утверждена Указом Президента Российской Федерации от 01.12.2016 г. № 64217 г.
24. Стратегия развития промышленности по обработке, утилизации и обезвреживанию отходов производства и потребления на период до 2030 г. Утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 января 2018 г. № 84-р.
25. Федеральный закон «О внесении изменений в Федеральный закон «Об отходах производства и потребления», отдельные законодательные акты Российской Федерации и признании утратившими силу отдельных законодательных актов (положений законодательных актов) Российской Федерации» от 29.12.2014 № 458-ФЗ (последняя редакция).
26. Федеральный закон РФ от 24.06.1998 № 89-ФЗ «Об отходах производства и потребления» в редакции от 07.04.2020 г. №117-ФЗ (вступил в силу 14.06.2020 г.).

27. Федеральный классификационный каталог отходов, утвержденный приказом Росприроднадзора № 242 от 22.05.20.
28. Хорошавин Л.Б., Беляков В.А., Свалов А.М. Основные технологии переработки промышленных и твердых коммунальных отходов. — М-во образования и науки РФ, Урал. федер. ун-т, Екатеринбург, 2016. — 220 с.
29. Bogner J.E. Waste management: Overview, Technologies, and Climate Change Implications / Landfills, Inc. — Wheaton, University of Illinois, Chicago Illinois USA. — WTO WORKSHOP, Genève, September 2009. — 36 p.
30. Global municipal solid waste generation projection 2016-2050 // Published by Ian Tiseo, Sep 24, 2018. <https://www.statista.com/statistics/916625/global-generation-of-municipal-solid-waste-forecast/>.
31. Guman O., Krinochkina O., Khomenko V., Wegner-Kozlova E. Municipal solid waste management in some countries of the world / E3S Web of Conferences, ERSME-2020. — 2020. — P. 1–13. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202021704010>.
32. Gumuła S., Piaskowska-Silarska M. Municipal waste treatment by thermal methods for generation of heat and electricity. — 5 p. <https://studylib.net/doc/5908858/social-economic-and-environmental-aspects-of-municipal-w>.
33. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Municipal_waste_statistics.
34. <https://nangs.org/news/renewables/rf-nuzhny-vlozheniya-v-zelenuyu-ekonomiku-vdvoe-bolyshe-drugih-liderov-po-vybrosam-eksperty>.
35. Industry as a partner for sustainable development waste management. International Solid Waste Association (ISWA) and United Nations Environment Programme // ISBN: 92-807-2194-2, 2002, P. 1–72. http://sustentabilidad.uai.edu.ar/pdf/ing/waste_management.pdf.
36. Tsui T.H., Wong J.W.C. A critical review: emerging bioeconomy and waste-to-energy technologies for sustainable municipal solid waste management // J. Waste Disposal & Sustainable Energy. — 2019. — Vol. 1. — P. 151–167. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42768-019-00013-z>.

INTERDISCIPLINARY APPROACH TO THE USE OF MODERN TECHNOLOGIES FOR THE SUSTAINABLE MUNICIPAL SOLID WASTE MANAGEMENT

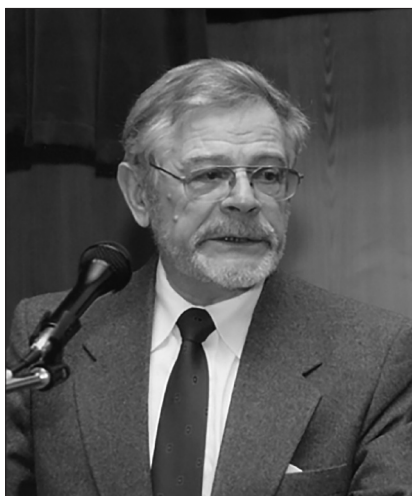
T.N. GAEVA, R.G. VASILOV

National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

The review is devoted to the analysis of advanced technologies for processing of municipal solid waste (MSW) with a high ecological and socio-economic potential which can be integrated into the MSW management system, giving it significant efficiency and sustainability. The advantages of the integrated interdisciplinary approach to the use of technologies for the MSW processing are highlighted. The importance of high attention to the involvement of society in the formation of MSW management system and the development of a spectrum of socio-humanitarian technologies are considered. The possibilities and prospects for the development of technologies for thermochemical processing of MSW are presented.

Keywords: ecology, sustainable MSW management system, circular economy, bioeconomy, thermochemical waste processing, burning, pyrolysis, gasification, industrial composting, socio-humanitarian technologies.

Памяти академика РАН А.С. Спирина (1931–2020)



30 декабря 2020 года скончался выдающийся ученый, исследователь с мировым именем академик РАН Александр Сергеевич Спирин. Уход из жизни людей такого ранга с трудом осознается в научном сообществе, так как их личность и дела уже давно стали реальной историей определенного научного направления.

Имя А.С. Спирина неразрывно связано с его учителем, крупным знатоком биохимии растений А.Н. Белозерским. Его приход молодым выпускником в лабораторию такого авторитетного исследователя уже сам по себе определил дальнейшую счастливую судьбу. В 1954 г. — окончание биофака МГУ, а в 1957 году — открытие некодирующих РНК с соответствующей публикацией в журнале «Nature» в 1958 г., ставшей мировой сенсацией. Такой старт в науке во многом предопределил все последующие события. Начинающий исследователь быстро вошел в академический круг, который был призван формировать молекулярную биологию в нашей стране.

Помимо преемственной экспериментальной работы в области биохимии нуклеиновых кислот, Спирин стал

основателем в 1967 году уникального института во вновь созданном академическом городке Пущино — Института белка АН СССР (он руководил им до 2001 года). В течение десятилетий отсюда выходили первоклассные работы, составлявшие красу и славу нашей науки. Параллельно (после смерти А.Н. Белозерского) с 1973 по 2012 гг. он заведовал кафедрой молекулярной биологии МГУ, был превосходным преподавателем, автором учебников по молекулярной биологии для вузов на протяжении 1980–2010-х годов. Излишне говорить о значимости этого раздела работы А.С. Спирина — фактически наша молодежь получала знания из первых рук создателей приоритетного направления современной науки.

Серии научных книг и статей, публичных выступлений Александра Сергеевича были образцовыми по форме и содержанию и становились знаковыми событиями в научной среде.

Среди наиболее выдающихся научных вкладов ученого следует указать, кроме вышеупомянутой работы 1950-х годов, на открытие в 1964 г. информосом — внутриклеточных информационных частиц в цитоплазме животных клеток (удостоено Ленинской премии 1976 г.) и изобретение бесклеточной системы биосинтеза белка непрерывного действия в 1988 году (с последующей разработкой препаративного синтеза белков вне клетки).

Безусловно, государственные, научные и общественные награды были вручены ему в соответствии со статусом и заслугами. Но есть еще и другая, нематериальная составляющая в деятельности ученого — его следование истине и справедливости. Здесь имя А.С. Спирина выглядит безукоризненно, и эти качества всегда будут помнить все, знавшие его, общавшиеся с ним и слушавшие его доклады.

Редколлегия и редсовет журнала глубоко скорбят об этой утрате и выражают соболезнование родным и близким.

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 31.12.2020
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 4,0. 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