



## ЭКОЛОГИЯ

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 317–323

*Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 317–323

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-317-323>

Научная статья

УДК 60:504.03

### Экологическая безопасность и перспективы развития малоотходных технологий в биотехнологическом производстве

В. Р. Вольников , А. Ю. Ульянов, Р. Р. Салихов, О. С. Дуракова,  
Н. Г. Авдеева, Ю. И. Самохвалова, О. А. Волох

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Россия, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

Вольников Владислав Романович, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, [volnikovvr@mail.ru](mailto:volnikovvr@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0791-895X>

Ульянов Александр Юрьевич, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, [lhv@microbe.ru](mailto:lhv@microbe.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6933-8278>

Салихов Руслан Римович, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, [lhv@microbe.ru](mailto:lhv@microbe.ru)

Дуракова Оксана Сергеевна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, [lhv@microbe.ru](mailto:lhv@microbe.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8823-3524>

Авдеева Наталья Георгиевна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, [lhv@microbe.ru](mailto:lhv@microbe.ru)

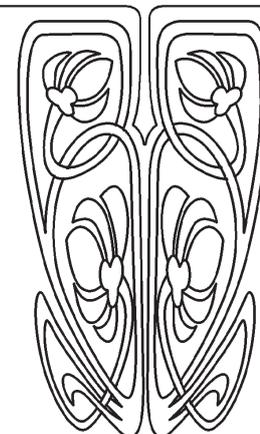
Самохвалова Юлия Игоревна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, [lhv@microbe.ru](mailto:lhv@microbe.ru)

Волох Оксана Александровна, заведующая отделом профилактических препаратов, [lhv@microbe.ru](mailto:lhv@microbe.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

**Аннотация.** Загрязнение окружающей среды промышленными отходами сегодня является актуальной проблемой. Особое место в перечне загрязняющих веществ имеют отходы биотехнологических предприятий и производств, деятельность которых связана с выпуском различных лекарственных препаратов. РосНИПЧИ «Микроб» является единственным в Российской Федерации производителем уникальных иммунобиологических лекарственных препаратов – вакцины холерной химической бивалентной и иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади (АИГ). В настоящее время в институте в качестве основы для питательных сред активно используется фибрин – отход при производстве АИГ; разработана технология регенерации спиртовых отходов; из отходов производства специфических компонентов холерной вакцины получены биологически активные вещества. Цель работы состояла в оценке перспективности использования отхода производства специфических компонентов холерной вакцины (холероген-анатоксина – Х-АТ, и О-антиген – О-АГ) – формализированного детоксицированного безмикробного фильтрата (ФБФ), в качестве питательной среды для культивирования производственных штаммов микроорганизмов. Было показано, что наилучшими методами снижения концентрации формалина являются автоклавирование и химическая нейтрализация водным раствором аммиака. При малообъемном культивировании штаммов *Vibrio cholerae* 569В и *V.cholerae* М-41 на всех вариантах экспериментальных сред на основе ФБФ был отмечен рост биомассы. Продукция антигенов холерного вибриона на уровне, сопоставимом с выращиванием на контрольной питательной среде, была зарегистрирована в варианте среды на основе отхода



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





производства О-АГ. Использование ФБФ в качестве питательной среды в перспективе позволит сократить объем образующихся отходов и снизить нагрузку на очистные сооружения института, что повысит экологическую безопасность производства.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, биотехнология, отходы производства, формалин, культивирование

**Для цитирования:** Вольников В. Р., Ульянов А. Ю., Салихов Р. Р., Дуракова О. С., Авдеева Н. Г., Самохвалова Ю. И., Волох О. А. Экологическая безопасность и перспективы развития малоотходных технологий в биотехнологическом производстве // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 317–323. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-317-323>

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

### Ecological safety and prospects of development of low-waste technologies in the biotechnology industry

V. R. Volnikov ✉, A. Yu. Ul'yanov, R. R. Salikhov, O. S. Durakova,  
N. G. Avdeeva, Yu. I. Samokhvalova, O. A. Volokh

Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russia

Vladislav R. Vol'nikov, volnikovvr@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0791-895X>

Alexander Yu. Ul'yanov, lhv@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6933-8278>

Ruslan R. Salikhov, lhv@microbe.ru

Oksana S. Durakova, lhv@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8823-3524>

Natalia G. Avdeeva, lhv@microbe.ru

Yulia I. Samokhvalova, lhv@microbe.ru

Oksana A. Volokh, lhv@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

**Abstract.** Environmental pollution with industrial waste is an urgent problem today. A special place in the list of pollutants belongs to waste from biotechnological enterprises and industries, whose activities are related to the production of various drugs. Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» is the only manufacturer of unique immunobiological drugs in the Russian Federation – bivalent chemical cholera vaccine and rabies immunoglobulin from horse blood serum (AIG). At present, the institute actively uses fibrin as a basis for nutrient media – a waste in the production of AIG; a technology for the regeneration of alcohol waste has been developed; biologically active substances were obtained from the production waste of specific components of the cholera vaccine. The aim of the work was to assess the prospects of using waste products from the production of specific components of cholera vaccine (cholero-gen-toxoid – X-AT, and O-antigen – O-AG) – formalized detoxified microbial-free filtrate (FMF), as a nutrient medium for the cultivation of industrial strains of microorganisms. It has been shown that the best methods for reducing formalin concentration are autoclaving and chemical neutralization with aqueous ammonia. During low-volume cultivation of *Vibrio cholerae* 569B and *V. cholerae* M-41 strains on all variants of experimental media based on PBP, an increase in biomass was noted. The production of *Vibrio cholerae* antigens at a level comparable to that of growing on a control nutrient medium was recorded in a medium variant based on O-AG production waste. The use of FMF as a nutrient medium in the future will reduce the volume of waste generated and reduce the load on the treatment facilities of the Institute, which will increase the environmental safety of production.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, biotechnology, industrial waste, formalin, cultivation

**For citation:** Volnikov V. R., Ul'yanov A. Yu., Salikhov R. R., Durakova O. S., Avdeeva N. G., Samokhvalova Yu. I., Volokh O. A. Ecological safety and prospects of development of low-waste technologies in the biotechnology industry. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2021, vol. 21, iss. 3, pp. 317–323. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2021-21-3-317-323>

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

### Введение

На базе научно-исследовательского противочумного института «Микроб» организовано производство уникальных иммунобиологических препаратов – вакцины холерной химической бивалентной и иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади (АИГ). Наряду с выпуском этих лекарственных средств ведутся активные научные исследования по направлению малоотходных технологий в иммунобиологическом производстве. В настоящее время в качестве основы для питательных сред активно используется фибрин – отход при производстве

АИГ [1, 2]; разработана технология регенерации спиртовых отходов [3]; из отходов производства специфических компонентов холерной вакцины получены биологически активные вещества [4].

Одним из этапов производства активных компонентов холерной химической вакцины является формоловая детоксикация безмикробного центрифугата после культивирования штаммов-продуцентов. Для этого используется формалин в концентрации 0,6%. Концентрация остаточного формалина в детоксицированном ФБФ составляет 0,5%. Дальнейшая его инактивация снизит антимикробное воздействие формалина. Классиче-



ским методом дезактивации формалина является его нейтрализация водным раствором аммиака. Для нашего исследования интерес представляли бентониты – сорбенты глинистой природы, которые в ранних исследованиях показывали высокие сорбционные свойства и, теоретически, могли бы стать эффективным методом освобождения от остаточного формалина в ФБФ, что позволит использовать его в качестве компонента питательной среды [5, 6].

Цель работы состояла в оценке перспективности использования отхода производства специфических компонентов холерной вакцины (холероген-анатоксин и О-антиген) – формализованного детоксицированного безмикробного фильтрата, в качестве питательной среды для культивирования производственных штаммов микроорганизмов.

### Материалы и методы

Объектом нашего исследования является отход производства специфических компонентов холерной вакцины (Х-АТ, О-АГ) – формализованный детоксицированный безмикробный фильтрат (ФБФ). Он был получен в процессе тангенциальной фильтрации безмикробного формализованного центрифугата после культивирования штаммов-продуцентов холерного токсина (ХТ) и О-АГ: *V. cholerae* 569В *V. cholerae* М-41.

Наличие формалина в фильтрате определяли качественной реакцией формальдегидов с фуксинсернистой кислотой. Количественное содержание регистрировали фотометрическим методом при длине волны 590 нм. Нейтрализацию формалина в среде осуществляли с применением физических (осаждение на сорбентах, стерилизация насыщенным водяным паром, стерилизующая фильтрация) и химических (нейтрализация формалина водным раствором аммиака) методов.

Экспериментальное малообъемное культивирование штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 проводилось в колбах объемом 250 мл на термостатируемом шейкер-инкубаторе в течение 18 часов при температуре 37°C для *V. cholerae* М-41 и 30°C для *V. cholerae* 569В. Объем среды составлял 25 мл, рН 8,0. Питательные среды, из которых были получены фильтраты, готовили на ферментативном гидролизате казеина (ФГК): ОРК (основной раствор казеина лабораторного приготовления) и ФГК Тип I (Hiimedia). Концентрация аминного азота в контрольных пробах составляла (0,10±0,05) %, в экспериментальных образцах – (0,095±0,01) %. Выращивание проводилось не только на цельных фильтратах, но так же и на

среде, представляющей собой смесь фильтрата и казеинового бульона в соотношении 1:1. Эффективность культивирования производственных штаммов на исследуемых средах оценивали, по урожайности биомассы и активности антигенов в реакции диффузионной преципитации с помощью специальных сывороток «О» и «АХС», реагирующих на О-антиген и холерный токсин соответственно [7].

### Результаты и их обсуждение

#### 1. Нейтрализация формалина с помощью различных методов

Первый этап нашей работы заключался в нейтрализации остаточного формалина в ФБФ. Это необходимо по причине того, что формальдегид оказывает ингибирующее воздействие на рост бактерий. Вследствие чего необходимо было максимально снизить концентрацию формалина. Для выполнения данной задачи нами было предложено несколько методов, первым из которых было осаждение на сорбентах – природных бентонитах двух различных немодифицированных фракций.

Установлено, что осаждение на данных сорбентах оказалось неэффективным (рис. 1).

Концентрация формалина во всех пробах, независимо от режима перемешивания, осталась практически на том же уровне. Предположительно, причина кроется в неподходящей структуре бентонитов – гранулированная форма не позволяет молекулам формалина задержаться на зернах сорбента, то есть путь к порам затруднен. В этой связи, возможно, более перспективным будет исследование адсорбционной способности модифицированных нанотрубками или глицерином вариантов адсорбентов, которые, по данным авторов [6], обладают достаточно высокой эффективностью в отношении многих химических соединений.

Следующий метод нейтрализации – автоклавирование и фильтрация. Было выявлено, что концентрация формалина при высокотемпературной обработке значительно снижается – примерно в 3 раза в фильтрате после выделения холерогена, и в 10 раз в фильтрате после выделения О-антигена (рис. 2). Такой результат связан с тем, что формальдегиды не выдерживают высокотемпературную обработку. При нагревании до 150°C формалин разлагается до метанола и углекислого газа (в нашем случае хватило нагрева до 121°C). Стерилизующая фильтрация ФБФ через глубинный фильтр с размером пор 0,22 мкм не привела к уменьшению содержания формалина, что свидетельствует о неэффективности данного метода.

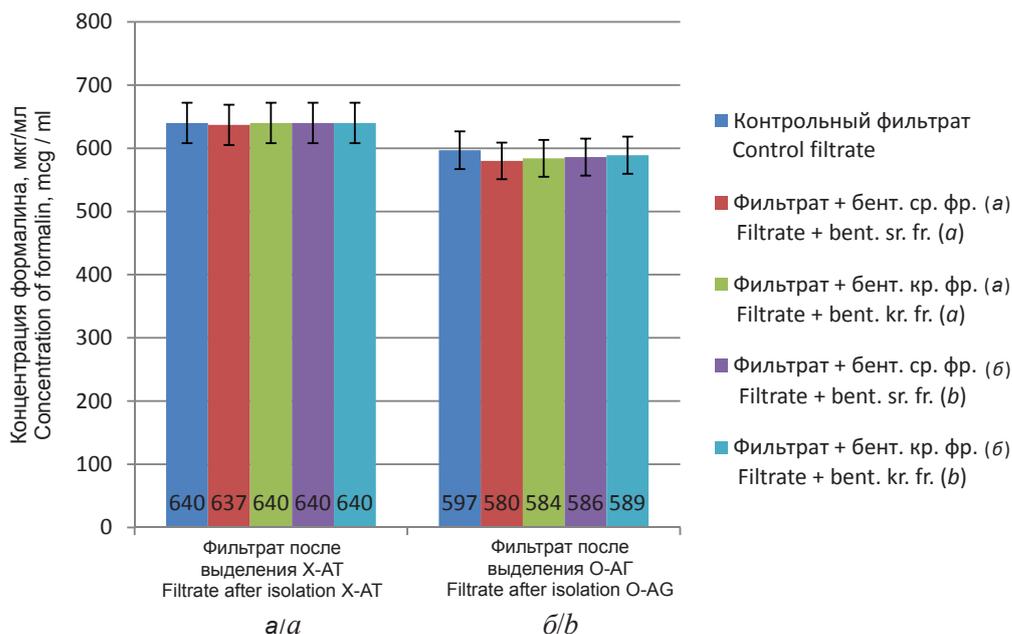


Рис. 1. Концентрация формалина в пробах после осаждения на сорбентах (а – в течение 1 часа; б – в течение 24 часов) (цвет online)

Fig. 1. Concentration of formalin in samples after sedimentation on sorbents (a – within 1 hour; b – within 24 hours) (color online)

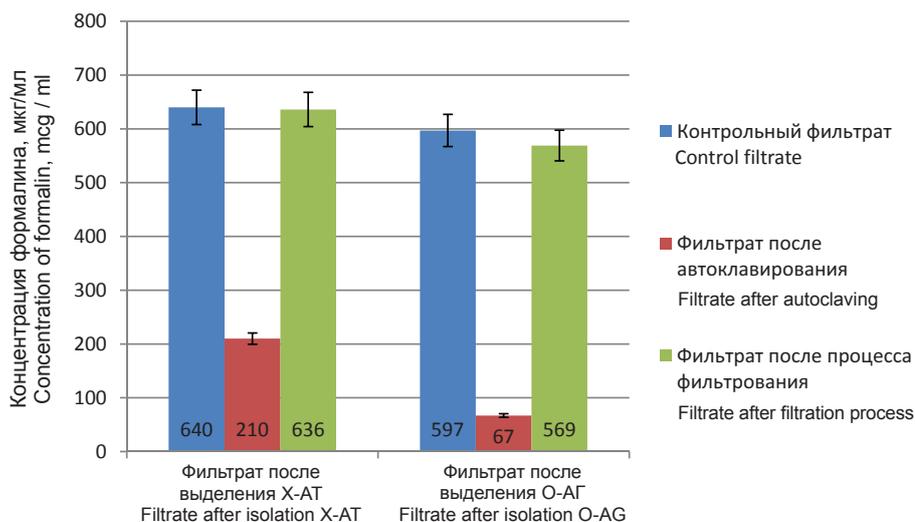


Рис. 2. Концентрация формалина в фильтратах после обработки в автоклаве (121°C) и при пропуске через фильтр ( $\varnothing = 0,22 \mu\text{м}$ ) (цвет online)

Fig. 2. Concentration of formalin in filtrates after autoclaving (121 °C) and passing through a filter ( $\varnothing = 0.22 \mu\text{m}$ ) (color online)

Нейтрализация формалина аммиаком показала наибольшую эффективность (рис. 3). При добавлении 1% аммиака от общего объема фильтрата концентрация формалина значительно уменьшается: в ФБФ после выделения холерогена – почти в 3,5 раза, после выделения О-антигена – более 1,5 раз. Такое сильное снижение содержания формалина в фильтрате объясняется тем, что формальдегид, вступая во взаимодействие с аммиаком, образует гексаметиленetetрамин, или уротропин.

## 2. Экспериментальное культивирование

Проводилось культивирование штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41. В эксперименте были использованы среды на основе фильтратов после выделения специфических компонентов холерной вакцины – обедненные (доля фильтрата – 100%) и обогащенные (доля фильтрата и казеинового бульона 50 на 50%). Формалин инактивировали с помощью автоклавирования.

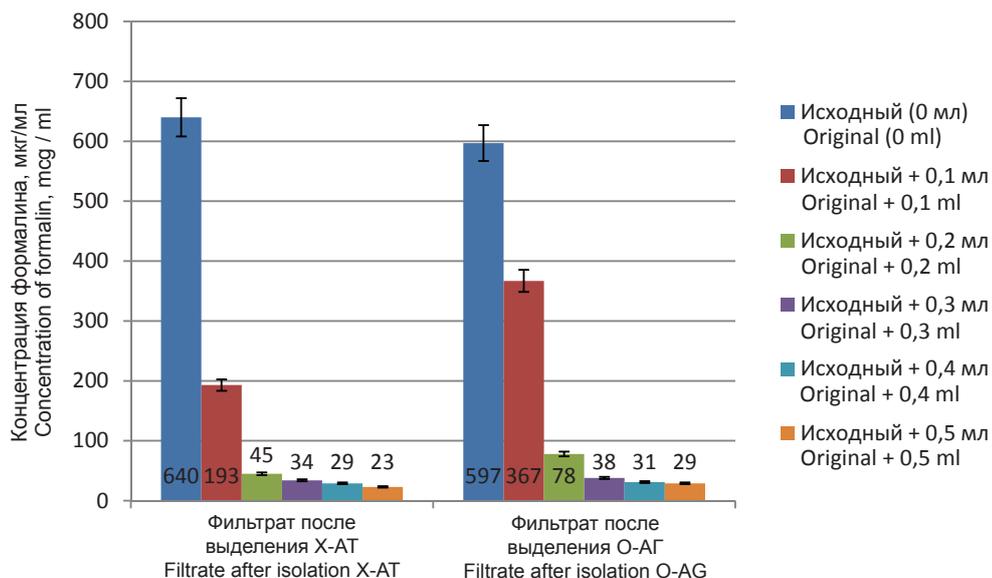


Рис. 3. Концентрация формалина в пробах после нейтрализации водным раствором аммиака (цвет online)

Fig. 3. Concentration of formalin in samples after neutralization with aqueous ammonia solution (color online)

Было выявлено, что на средах после выделения любого из антигенов, основой которого послужил раствор казеина лабораторного приготовления, рост бактерий регистрировался, но на довольно низком уровне. Это верно как для обедненных вариантов среды, так и смешанных с бульоном вариантов. Активность антигенов не была зарегистрирована ни в одном из образцов. Культивирование на средах после вы-

деления O-антигена, основой которого был ФГК Тип I (Himedia), показало лучшие результаты (таблица). Урожайность биомассы холерных вибрионов обоих штаммов была сопоставима с контрольными образцами, а активность специфических антигенов в реакции диффузионной преципитации была зарегистрирована до титра 1 на 4, что допускается нормативной документацией.

**Результаты культивирования штаммов *V. cholerae* на фильтратах с основой из ФГК**  
**Results of cultivation of *V. cholerae* strains on filtrates with a base of СЕН**

№ фильтрата Filtrate No.	Показатель / Indicator		
	Концентрация, млрд. м.к./мл Concentration, bill. m.c. / ml	Активность O-АГ Activity O-AG	Активность X-АГ Activity X-AT
Штамм <i>V. cholerae</i> 569B / Strain <i>V. cholerae</i> 569B			
Фильтрат + бульон 1:1 / Filtrate + bouillon 1:1	43±5	+1/4	+ц
Контроль / Control	59±3	+1/8	+ц
Штамм <i>V. cholerae</i> M-41 / Strain <i>V. cholerae</i> M-41			
Фильтрат + бульон 1:1 / Filtrate + bouillon 1:1	53±5	+1/4	–
Контроль / Control	56±4	+1/4	–

морфология клеток холерного вибриона по сравнению с контрольными образцами не изменилась (рис. 4).

На фильтратах, инактивация формалина в которых производилась с помощью нейтрализации водным раствором аммиака, рост

биомассы был стабильно ниже контрольных образцов. Активность антигенов не была зарегистрирована ни в одном из образцов. Предположительно, это может быть связано с выбором неоптимального количества добавленного аммиака.

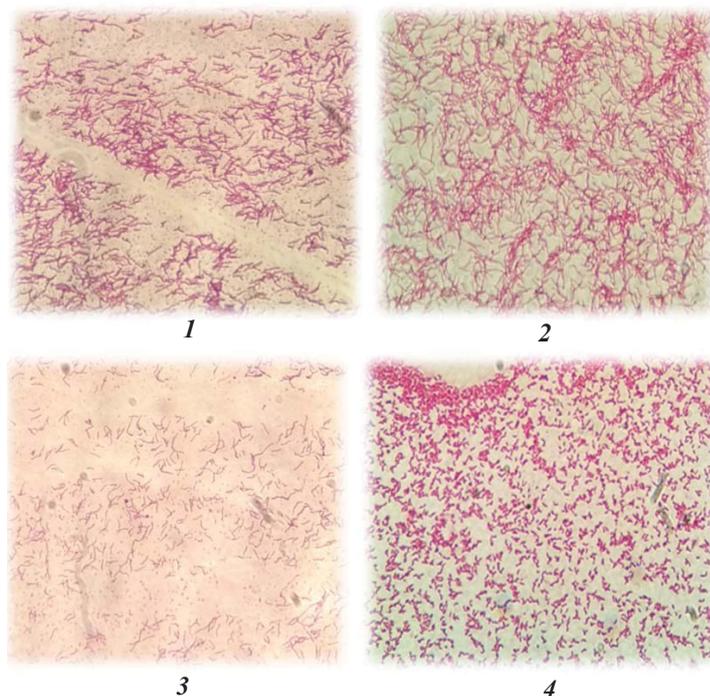


Рис. 4. Микроскопия клеток *Vibrio cholerae* на мазках по Граму: 1 – обогащенный фильтрат ФГК, штамм *V.cholerae* М-41; 2 – контрольный образец ФГК; 3 – обогащенный фильтрат ФГК, штамм *V.cholerae* 569В; 4 – контрольный образец ФГК

Fig. 4. Microscopy of *Vibrio cholerae* cells on Gram smears: 1 – enriched filtrate CEH, strain *V. cholerae* M-41; 2 – control sample of CEH; 3 – enriched filtrate CEH, strain *V. cholerae* 569В; 4 – control sample of CEH

### Заключение

Таким образом, была экспериментально доказана возможность использования фильтрата – отхода производства холерной вакцины, в качестве питательной среды для культивирования производственных штаммов. Установлена высокая эффективность метода нейтрализации остаточного формалина в ФБФ автоклавированием и химической инактивацией водным раствором аммиака. Использование фильтрата в качестве питательной среды в перспективе позволит сократить объем образующихся отходов, снизить нагрузку на очистные сооружения института и обеспечить экологическую безопасность производства.

Дальнейшей перспективой данного исследования является подбор оптимальных условий химической нейтрализации формалина в ФБФ и оценка возможности их использования для культивирования других видов микроорганизмов.

### Список литературы

1. Антоничева М. В., Нижегородцев С. А., Еремин С. А., Аленкина Т. А., Шульгина И. В., Белоусов А. Д., Жулидов И. М., Никифоров А. К. Питательная среда

для глубинного культивирования холерного вибриона. Патент RU № 2425866 РФ, опубл. 10.08.11 г. Бюл. № 22.

2. Волох О. А., Антоничева М. В., Авдеева Н. Г., Вахрушина Н. И., Никифоров А. К. Питательная среда для глубинного культивирования туляремиального микроба. Патент RU № 2518282, МПК С12N1/20. Бюлл. № 16. 2014.
3. Жулидов И. М. Разработка биотехнологических приемов малоотходных технологий в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2013. 18 с.
4. Громова О. В., Кузьмиченко И. А., Киреев М. Н., Нижегородцев С. А., Корсуков В. Н. Новый способ получения комплекса ферментов холерного вибриона протеовибрина с помощью ультрафильтрации // Acta Biomedica Scientifica. 2012. № 5-1 (87). С. 201–205
5. Котельников Д. Д., Конюхов А. И. Глинистые минералы осадочных пород. М. : Недра, 1986. 247 с.
6. Истрашкина М. В., Атаманова О. В., Тихомирова Е. И. Особенности адсорбции ароматических аминосоединений на различных вариантах модифицированного бентонита // Известия Самарского научного центра РАН. 2016. Т. 18, № 2 (2). С. 381–384.
7. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion // Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 1953. Vol. 32. P. 231–240.



## References

1. Antonycheva M. V., Nizhegorodtsev S. A., Eremin S. A., Alenkina T. A., Shul'gina I. V., Belousov A. D., Zhulidov I. M., Nikiforov A. K. *Nutrient medium for submerged cultivation of cholera vibrio*. RF Patent No. 2425866, 10.08.2011 (in Russian).
2. Volokh O. A., Antonycheva M. V., Avdeeva N. G., Vakhrushina N. I., Nikiforov A. K. *Nutrient medium for submerged cultivation of tularemia microbe*. RF Patent No. 2518282, 10.06.2014 (in Russian).
3. Zhulidov I. M. *Development of biotechnological methods of low-waste technologies in the production of heterologous anti-rabies immunoglobulin*. Thesis Dis. Cand. Sci. (Biol.). Saratov, 2013. 18 p. (in Russian).
4. Gromova O. V., Kuz'michenko I. A., Kireev M. N., Nizhegorodtsev S. A., Korsukov V. N. New way of isolation of enzyme complex of cholera Vibrio – proteovibrin by means of ultrafiltration. *Acta Biomedica Scientifica*, 2012, no. 5-1 (87), pp. 201–205 (in Russian).
5. Kotelnikov D. D., Konyukhov A. I. *Glinistye mineral osadochnykh porod* [Clay Minerals of Sedimentary Rocks]. Moscow, Nedra Publ., 1986. 247 p. (in Russian).
6. Istrashkina M. V., Atamanova O. V., Tikhomirova E. I. Features of adsorption of aromatic amino compounds on different variants of modified bentonite. *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2016, vol. 18, no. 2 (2), pp. 381–384 (in Russian).
7. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion. *Acta Pathol. et Microbiol. Scand.*, 1953, vol. 32, pp. 231–240.

Поступила в редакцию 03.05.21, после рецензирования 12.05.21, принята к публикации 15.05.21  
Received 03.05.21, revised 12.05.21, accepted 15.05.21