

Читать  
онлайн  
Read  
online

Королик В.В., Шеина Н.И., Мялина Л.И., Сазонова Л.П., Другова Е.Д.

## Первичная санитарно-гигиеническая оценка микроорганизмов, применяемых в биотехнологиях

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997 Москва, Россия

**Введение.** Использование микроорганизмов на биотехнологических предприятиях и применение в сельском и лесном хозяйстве может сопровождаться микробным загрязнением окружающей среды и оказывать неблагоприятное влияние на здоровье людей.

**Цель исследования** — разработка и внедрение в практику количественных критериев патогенности биотехнологических микроорганизмов в качестве первого этапа оценки их безопасности.

**Материалы и методы.** Изучены полудетальная ( $LD_{50}$ ) и пороговая ( $Lim_{bact}$ ) дозы, диссеминация во внутренних органах, токсигенность и ферменты патогенности 33 штаммов сапрофитных, условно патогенных и патогенных бактерий, 250 штаммов 10 родов, предлагаемых для применения в биотехнологиях, и 11 штаммов, уже используемых в качестве активной субстанции биопрепаратов.

**Результаты.** На основе критериев первичной санитарно-гигиенической оценки микроорганизмы разделены на три группы: штаммы, рекомендуемые к промышленному применению; штаммы, находящиеся на грани риска применения; штаммы, не рекомендуемые к использованию. Из 250 изученных штаммов микроорганизмов, предлагаемых для применения в биотехнологиях, 38,9% не обладают патогенными свойствами и могут быть использованы, 41,1% являются условно патогенными и находятся на грани риска применения и 20,1% в силу наличия патогенных свойств не рекомендованы для использования в биотехнологиях. Исследование патогенных свойств 11 штаммов бактерий, входящих в состав современных микробиологических препаратов, показало, что они относятся к непатогенным штаммам.

**Ограничения исследования.** Разработка и апробирование критериев первичной санитарно-гигиенической оценки микроорганизмов, предлагаемых для биотехнологий, проведены на большом материале (более 250 штаммов) при однократном воздействии высоких доз, что не позволило оценить специфические эффекты воздействия штаммов при длительном воздействии и может быть предметом дальнейших исследований.

**Заключение.** Критериями первичной санитарно-гигиенической оценки микроорганизмов, предлагаемых для применения в биотехнологиях, являются: полудетальная ( $LD_{50}$ ) и пороговая дозы ( $Lim_{bact}$ ), диссеминация во внутренних органах, токсигенность и активность ферментов патогенности. Все микроорганизмы, планируемые для использования в биотехнологиях, должны быть изучены для определения возможных патогенных свойств. Биопрепараты, используемые в настоящее время в народном хозяйстве, в качестве активной субстанции содержат только сапрофитные микроорганизмы. Обеспечение биобезопасности должно развиваться в том числе и в направлении изучения специфического воздействия микроорганизмов и биопрепаратов на их основе на иммунную систему и состояние микроценоза организма.

**Ключевые слова:** критерии патогенности; микроорганизмы; биопрепараты; биотехнология

**Соблюдение этических стандартов.** Исследование не требует заключения по биомедицинской этике, поскольку является результатом обобщения многолетнего труда научных работников в данном направлении.

**Для цитирования:** Королик В.В., Шеина Н.И., Мялина Л.И., Сазонова Л.П., Другова Е.Д. Первичная санитарно-гигиеническая оценка микроорганизмов, применяемых в биотехнологиях. *Гигиена и санитария*. 2023; 102(2): 135–140. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-2-135-140> <https://elibrary.ru/kzxhja>

**Для корреспонденции:** Королик Виктор Вячеславович, доктор мед. наук, профессор, профессор кафедры гигиены ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва. E-mail: korolikvv52@gmail.com

**Участие авторов:** Королик В.В., Шеина Н.И. — концепция и дизайн исследования, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Мялина Л.И. — сбор и обработка материала; Сазонова Л.П. — сбор материала; Другова Е.Д. — обработка материала. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Инициативная научно-исследовательская работа.

Поступила: 29.05.2022 / Принята к печати: 08.12.2022 / Опубликовано: 25.03.2023

## Victor V. Korolik, Natalia I. Sheina, Lyubov P. Mjalina, Lyubov P. Sazonova, Elena D. Drugova Primary sanitary and hygienic assessment of microorganisms used in biotechnology

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation

**Introduction.** The use of microorganisms in biotechnological enterprises, agriculture, and forestry can be accompanied by microbial contamination of the environment and have an adverse effect on the human health.

**The purpose of the research** is to develop and put into practice quantitative criteria for the pathogenicity of biotechnological microorganisms as the first stage in assessing their safety.

**Materials and methods.** Lethal dose ( $LD_{50}$ ) and “threshold” ( $Lim_{bact}$ ) doses, dissemination in internal organs, toxigenicity, and “pathogenicity enzymes” of thirty-three strains of saprophytic, opportunistic and pathogenic bacteria, 250 strains of 10 genera proposed for use in biotechnology, and 11 strains already used as active biopreparation substances were investigated.

**Results.** Based on the criteria for primary sanitary and hygienic assessment, microorganisms were selected into three groups: strains recommended for industrial use; strains at risk of application; strains not recommended for use. Among the studied 250 strains of microorganisms proposed for use in biotechnology, 38.9% did not have pathogenic properties and can be used, 41.0% are conditionally pathogenic and are at risk of use, and 20.1% are not recommended for use in biotechnology due to the presence of pathogenic properties. A study of the pathogenic properties of 11 strains of bacteria that are the part of modern biological products showed that they belong to non-pathogenic microorganisms.

**Limitations.** The development and testing of the criteria for the primary sanitary and hygienic assessment of microorganisms proposed for biotechnology were carried out on a large material (more than 250 strains) with a single exposure to high doses, which did not allow us to assess the specific effects of exposure to strains during long-term exposure and may be the subject of further research.

**Conclusion.** The criteria for the primary sanitary and hygienic assessment of microorganisms proposed for use in biotechnologies include average lethal and “threshold” doses dissemination in internal organs, toxigenicity and activity of “pathogenicity enzymes”. All planned for use in biotechnology microorganisms should be examined for possible pathogenic properties. Biological products used in real time in the national economy contain only saprophytic microorganisms as an active substance. The problem of biosafety should be solved in the direction of studying the specific effect of microorganisms and biological products on the immune system influence and the state of the microecology of the body.

**Keywords:** biotechnological (industrial) microorganisms; pathogenicity criteria; biological products; biotechnology

**Compliance with ethical standards.** The conducted study does not require a conclusion on biomedical ethics since it is a generalization of many years of work of researchers on this issue.

**For citation:** Korolik V.V., Sheina N.I., Mjalina L.I., Sazonova L.P., Drugova E.D. Primary sanitary and hygienic assessment of microorganisms used in biotechnology. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(2): 135–140. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-2-135-140> <https://elibrary.ru/kzxhja> (In Russian)

**For correspondence:** Victor V. Korolik, MD, PhD, DSci, Professor, professor of hygiene department of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation. E-mail: korolikvv52@gmail.com

#### Information about authors:

Sheina N.I., <https://orcid.org/0000-0002-2314-183X>  
Sazonova L.P., <https://orcid.org/0000-0001-9312-996X>

Mjalina L.I., <https://orcid.org/0000-0002-8136-8549>  
Drugova E.D., <https://orcid.org/0000-0003-4721-0518>

**Contribution:** Korolik V.V., Sheina N.I. – concept and design of the study, statistical analysis, writing text, editing; Mjalina L.I. – collection and processing of material; Sazonova L.P. – collection of material; Drugova E.D. – material processing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

Received: May 29, 2022 / Accepted: December 8, 2022 / Published: March 25, 2023

## Введение

Современные биотехнологии находят широкое применение в промышленности, сельском хозяйстве, ремедиационных процессах в объектах окружающей среды [1–4]. Широко обсуждаются положительные и отрицательные аспекты использования бактерий в качестве пробиотиков [5–8]. Однако в процессе эксплуатации биотехнологических производств, применения биопрепаратов в сельском и лесном хозяйстве в качестве микробиологических удобрений и средств защиты растений возможно значительное загрязнение биотехнологическими микроорганизмами производственной и окружающей среды. Это создаёт потенциальную опасность неблагоприятного воздействия на здоровье людей.

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о возникновении специфических и неспецифических заболеваний у лиц, работающих на предприятиях биотехнологии, и населения, проживающего в районах расположения таких производств [9–11]. В связи с этим необходимы исследования для получения количественных критериев оценки патогенных свойств штаммов микроорганизмов, предлагаемых для использования в биотехнологиях.

**Цель исследования** – разработка и внедрение в практику количественных критериев патогенности биотехнологических микроорганизмов в качестве первого этапа оценки их безопасности.

## Материалы и методы

Начальным этапом работы стало определение вирулентности и токсигенности 33 штаммов, принадлежащих к сапрофитным, условно патогенным и патогенным микроорганизмам.

В качестве сапрофитных микроорганизмов исследовано 7 штаммов *Bacillus thuringiensis*, представляющих пять серотипов (*var. insectus* – 1 штамм, *var. galleria* – 2 штамма, *var. dendrolimus* – 2 штамма, *var. thuringiensis* – 1 штамм, *var. Berliner* – 1 штамм). Штаммы этих микроорганизмов используются для получения различных бактериальных инсектицидов.

Группу условно патогенных микроорганизмов представляли 6 музейных штаммов *Aeromonas* (*A. anaerogenes* – 3 штамма, *A. hydrophila* – 3 штамма) и 15 музейных штаммов *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* – 3 штамма, *P. alcaligenes* – 3 штамма, *P. fluorescens* – 3 штамма, *P. putida* – 3 штамма, *P. stutzeri* – 3 штамма). Значение этих бактерий в биологи-

ческом загрязнении окружающей среды и их роль как потенциальных возбудителей заболеваний человека достаточно велики [12, 13].

В качестве патогенных микроорганизмов исследованы свойства трёх музейных энтеропатогенных штаммов *Escherichia* (*E. coli* O-26, *E. coli* O-157, *E. coli* O-111) и двух музейных штаммов патогенных энтеробактерий *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium* ATCC-13311, *S. typhimurium* 91). Эти микроорганизмы вызывают кишечные инфекции у людей и животных.

Изучены следующие показатели патогенных свойств микроорганизмов: полулетальная доза ( $LD_{50}$ ), диссеминация штаммов во внутренних органах экспериментальных животных, токсигенность, пороговая доза ( $Lim_{bact}$ ), ферменты патогенности.

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах с массой тела 18–20 г. Условия содержания лабораторных животных и работы с ними соответствовали утверждённому стандарту<sup>1,2</sup>.

Полулетальную дозу определяли после однократного внутрибрюшинного введения взвесей суточных культур с содержанием в 1 мл физиологического раствора  $10^3$ – $10^9$  КОЕ. Культуру микроорганизмов смывали физиологическим раствором с поверхности плотной питательной среды, дающей оптимальный рост исследуемых микроорганизмов. Полученную взвесь стандартизировали по оптическому стандарту мутности, соответствующему  $10^9$  микробных клеток в 1 мл. Из полученной взвеси микроорганизмов готовили последовательные десятикратные разведения физиологическим раствором. Контроль разведения осуществляли путём посева разведений  $10^2$  микробных клеток в 1 мл на плотную питательную среду в чашки Петри с последующей инкубацией в термостате и подсчётом выросших колоний. Каждое разведение бактериальной взвеси микроорганизмов вводили внутрибрюшинно мышам экспериментальной группы (6 особей). Мышам контрольной группы (6 особей) вводили внутрибрюшинно по 1 мл физиологического раствора. Наблюдения за животными проводили в течение 3 сут, отмечая клинические проявления заболевания. Учитывая число

<sup>1</sup> ГОСТ Р 53434–2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии, приказ № 544-ст от 02.12.2009 г.

<sup>2</sup> Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований» (с изменениями и дополнениями).

Таблица 1 / Table 1

**Критерии патогенности микроорганизмов, предлагаемых к использованию в биотехнологиях**  
**Criteria for the pathogenic properties of microorganisms proposed for use in biotechnology**

Критерии патогенности Pathogenicity criteria	Группа 1 1 <sup>st</sup> group	Группа 2 2 <sup>nd</sup> group	Группа 3 3 <sup>rd</sup> group
Полулетальная доза LD <sub>50</sub> , КОЕ/жив. Half-lethal dose LD <sub>50</sub> , CFU/animal	> 10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	< 10 <sup>7</sup>
Пороговая доза, Lim <sub>bact</sub> , КОЕ/жив. Threshold dose, Lim <sub>bact</sub> , CFU/living	> 10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	< 10 <sup>7</sup>
Диссеминация Dissemination	Отсутствие после 15-дневного наблюдения Absence after 15 days of observation	Отсутствие после 15-дневного наблюдения Absence after 15 days of observation	В течение 15 дней наблюдения Within 15 days of observation
Токсигенность / Toxigenicity	0	2 DIm/мл	> 2 DIm/мл
Ферменты патогенности: "Enzymes of pathogenicity"			
лецитиназа / lecithinase	≤ 1 : 32 – 1 : 64	≤ 1 : 128	≤ 1 : 128
желатиназа / gelatinase	≤ 1 : 4 – 1 : 8	≤ 1 : 18	≤ 1 : 18
гиалуронидаза / hyaluronidase	≤ 1 : 8 – 1 : 16	≤ 1 : 32	≤ 1 : 64
гемолизины / hemolysins	≤ 1 : 8	≤ 1 : 16	≤ 1 : 16
термолабильный / thermolabile	≤ 1 : 8	≤ 1 : 16	≤ 1 : 16
термостабильный / thermostable			
Декарбоксилазная активность Decarboxylase activity	Более чем к 8 аминокислотам без образования аминов (кадаверина, путресцина, гистамина, тирамина, триптамина) More than to 8 amino acids without the formation of amines: cadaverine, putrescine, histamine, tyramine and tryptamine	Более чем к 8 аминокислотам без образования аминов (кадаверина, путресцина, гистамина, тирамина, триптамина) More than to 8 amino acids without the formation of amines: cadaverine, putrescine, histamine, tyramine and tryptamine	К 1–8 аминокислотам с образованием одного или нескольких аминов: гистамина, тирамина, кадаверина, путресцина и триптамина To 1–8 amino acids to form one or more amines: histamine, tyramine, cadaverine, putrescine and tryptamine

летальных исходов, рассчитывали средневирулентную дозу методом пробит-анализа, доверительные интервалы рассчитывали методом Финни<sup>3</sup>.

Для изучения скорости проникновения микроорганизмов из брюшной полости в кровяное русло определяли пороговую дозу (Lim<sub>bact</sub>), то есть количество микроорганизмов, вызывающее бактериемию через 30 мин после внутрибрюшинного введения взвеси изучаемых микроорганизмов.

Приготовление и введение микробных взвесей осуществляли аналогично определению полулетальной дозы. Через 30 мин после внутрибрюшинного введения у мышей из хвостовой вены отбирали кровь для посева на плотную питательную среду. Посевы выращивали при оптимальной температуре и продолжительности культивирования для данного вида микроорганизмов, затем проводили идентификацию.

Для определения диссеминации штаммов во внутренних органах введение тех же взвесей микроорганизмов производили аналогично определению полулетальной и пороговой доз. Наблюдение осуществляли в течение 30 сут, вскрывая павших животных по мере их гибели и делая посевы из внутренних органов методом отпечатков.

При отсутствии летальных исходов в динамике эксперимента (3-и, 10-е, 17-е, 30-е сутки) в стерильных условиях забивали по 3 мыши, заражённых каждым последовательным разведением. При вскрытии изучали внешние морфологические изменения внутренних органов (сердца, лёгких, печени, почек), затем проводили определение диссеминации методом отпечатков. Инкубировали посевы в термостате при температуре оптимального роста изучаемых микроорганизмов. Через 24–48 ч осуществляли идентификацию микроорганизмов путём изучения морфологии колоний, микроскопии мазков и определения дифференциально-диагностических биохимических свойств.

Токсигенность определяли, вводя белым мышам внутривенно центрифугаты суточных культур, выращенных в мясопептонном бульоне при оптимальной температуре. Микробную взвесь центрифугировали при 5000 об./мин. В течение 30 мин готовили 3–4 последовательных двукратных разведения физиологическим раствором. Каждое разведение по 0,5 мл вводили трём белым мышам в боковую хвостовую вену. В контроле трём мышам вводили по 0,5 мл стерильного мясопептонного бульона, следующим трём мышам – по 0,5 мл физиологического раствора. Учёт токсигенности проводили по максимальному разведению центрифугата, вызывающего гибель животных через 24 ч после введения, при наличии живых контрольных мышей. Выражали токсигенность в единицах DIm/мл (наименьшее количество токсина микроорганизма, вызывающее гибель лабораторных животных). При этом токсигенность количественно равна 2 DIm/мл, если погибшие животные получили чистый декантат; 4 DIm/мл – при гибели животных, получивших как чистый декантат, так и разведение 1 : 1; 8 DIm/мл – при гибели животных от введения первых трёх пар разведений и т. д.

На этом этапе возможно было закончить изучение патогенных свойств штамма при установлении хотя бы одного из перечисленных критериев в количественных пределах, представленных ниже (табл. 1).

Для более полной характеристики вирулентности или уточнения свойств изучаемых микроорганизмов в случае получения сомнительных результатов, в особенности условно патогенных штаммов, исследовали активность ферментов патогенности (гиалуронидазы, желатиназы, лецитиназы, гемолизины и декарбоксилаз аминокислот), которые могут активно участвовать в патологических процессах в организме. Ферменты патогенности определяли с помощью общепринятых методик<sup>3</sup>. Для изучения декарбоксилазной активности использовали модифицированный метод Меллера (цит. по: В.В. Королик, 1999) [14].

<sup>3</sup> Finney D.J. Probit analysis 3<sup>rd</sup> edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1979: 33 p.

Таблица 2 / Table 2

**Оценка патогенности микроорганизмов различных таксономических групп**  
**Assessment of the pathogenicity of microorganisms of various taxonomic groups**

Род и вид микроорганизмов Genus and species of microorganisms	LD <sub>50</sub> , КОЕ/жив. (CFU/animal)	Lim <sub>bact</sub> , КОЕ/жив. (CFU/animal)	Токсигенность, Длм/мл Toxigenicity, Dlm/ml
<i>Сапрофитные микроорганизмы / Saprophytic microorganisms</i>			
<i>Bacillus</i> (6 видов, 72 штамма / 6 species, 72 strains)	8 · 10 <sup>8</sup> –7 · 10 <sup>9</sup>	7 · 10 <sup>8</sup> –7 · 10 <sup>9</sup>	Нет / No
<i>Brevibacterium</i> (4 вида, 19 штаммов / 4 species, 19 strains)	10 <sup>8</sup> –5 · 10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup> –6 · 10 <sup>9</sup>	Нет / No
<i>Micrococcus glutamicus</i> (4 штамма / 4 species)	6 · 10 <sup>9</sup> –7 · 10 <sup>9</sup>	2–7 · 10 <sup>9</sup>	Нет / No
<i>Условно патогенные микроорганизмы / Opportunistic pathogens</i>			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (8 штаммов / 8 species)	10 <sup>8</sup> –7 · 10 <sup>8</sup>	2–4 · 10 <sup>8</sup>	0–2
<i>Enterobacter aerogenes</i> (7 штаммов / 7 species)	9 · 10 <sup>8</sup> –5 · 10 <sup>9</sup>	3 · 10 <sup>7</sup>	0–2
<i>E.coli</i> (52 штамма / 52 species)	10 <sup>6</sup> –5 · 10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> –5 · 10 <sup>6</sup>	4
<i>Haemophilus influenzae</i> (10 штаммов / 10 species)	10 <sup>7</sup> –8 · 10 <sup>7</sup>	3–6 · 10 <sup>8</sup>	0–2
<i>Pseudomonas</i> (5 видов, 26 штаммов / 5 species, 26 strains)	10 <sup>7</sup> –6 · 10 <sup>9</sup>	10 <sup>7</sup> –9 · 10 <sup>8</sup>	0–2
<i>Патогенные микроорганизмы / Pathogenic microorganisms</i>			
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (8 штаммов / 8 strains)	10 <sup>7</sup> –4 · 10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	4
<i>Moraxella nonlignefaciens</i> (9 штаммов / 9 strains)	10 <sup>5</sup> –2 · 10 <sup>6</sup>	2–5 · 10 <sup>7</sup>	2–4

## Результаты

Результаты исследований показали, что полудетальная доза (LD<sub>50</sub>) сапрофитных микроорганизмов находилась в пределах 8,1 · 10<sup>8</sup>–7,3 · 10<sup>9</sup> КОЕ на 1 животное (КОЕ/жив.); условно патогенных – в пределах 1,6 · 10<sup>7</sup>–8,8 · 10<sup>7</sup> КОЕ/жив.; патогенных – в пределах 1,5 · 10<sup>5</sup>–8,4 · 10<sup>6</sup> КОЕ/жив.

Пороговая доза (Lim<sub>bact</sub>) сапрофитных микроорганизмов находилась в пределах 6,6 · 10<sup>8</sup>–6,6 · 10<sup>9</sup> КОЕ/жив., условно патогенных бактерий – 4,1 · 10<sup>7</sup>–9,6 · 10<sup>7</sup> КОЕ/жив., патогенных бактерий – 2,1 · 10<sup>4</sup>–5 · 10<sup>6</sup> КОЕ/жив. Диссеминация во внутренних органах экспериментальных животных определена только при введении культур штаммов *S. typhimurium*.

Токсигенность всех штаммов сапрофитных бактерий составила 0 Длм/мл, условно патогенных бактерий – от 0 до 2 Длм/мл. Энтеропатогенные штаммы *E. coli* обладали токсигенностью 4 Длм/мл, а штаммы *S. typhimurium* – 4–8 Длм/мл.

Декарбонизирующая активность сапрофитных и условно патогенных микроорганизмов обнаружена к восьми аминокислотам и более без образования наиболее токсичных аминов (кадаверина, путресцина, гистамина, тирозина и триптамина). Патогенные бактерии отличались узким спектром декарбонизации к 1–8 аминокислотам с образованием одного или нескольких токсичных аминов.

Активность гиалуронидазы у сапрофитных микроорганизмов определена в титрах до 1 : 16; в группе условно патогенных – до 1 : 32; у штаммов патогенных бактерий – до 1 : 64. Желатиназная активность сапрофитных микроорганизмов не превышала титра 1 : 8; условно патогенных – 1 : 16. В группе патогенных бактерий желатиназной активностью в разведении 1 : 32 обладал только один штамм *S. typhimurium* – АТСС-13311. Другие штаммы сальмонелл и кишечных палочек желатин не разжижали. Лецитиназную активность у сапрофитных микроорганизмов *B. thuringiensis* проявили 4 серотипа из 6 в титрах до 1 : 64; условно патогенных – до 1 : 128. Исследованные штаммы патогенных бактерий лецитиназной активностью не обладали.

Активность термолabileного и термостабильного гемолизина у сапрофитных микроорганизмов *B. thuringiensis* не превышала титра 1 : 8. Условно патогенные микроорганизмы проявляли активность термолabileного гемолизина в разведениях до 1 : 16. Термостабильный гемолизин у псевдомонад определен в титре до 1 : 16, у аэромонад он отсутствовал. У патогенных бактерий термолabileный гемолизин выявлен в титре 1 : 32. Активность термостабильного гемолизина у штаммов сальмонелл установлена в разведении 1 : 32, у штаммов *E. coli* она отсутствовала.

Результаты исследования патогенных свойств предлагаемых для использования в биотехнологиях штаммов микроорганизмов позволили разделить их на три группы (см. табл. 1).

**Группа 1.** Штаммы микроорганизмов рекомендованы к использованию в биотехнологиях, если количественно определяются все показатели, присущие сапрофитным микроорганизмам.

**Группа 2.** Штаммы микроорганизмов находятся на грани риска применения. К этой группе следует относить штаммы, свойства которых соответствуют хотя бы одному из показателей группы 2, а остальные критерии могут соответствовать показателям группы 1. В этом случае для уточнения необходимо проводить изучение ферментов патогенности.

**Группа 3.** Штаммы микроорганизмов не рекомендуется использовать на предприятиях биотехнологии, если свойства штаммов соответствуют одному или большему числу критериев группы 3.

В соответствии с показателями, представленными выше, исследованы патогенные свойства 250 коллекционных штаммов микроорганизмов, предполагаемых для применения в биотехнологиях, которые получены из ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ» и ГосНИИГенетика. Исследованные штаммы относились к 10 родам: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevia*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*. Из всего числа изученных микроорганизмов только 38,9% из них являлись непатогенными и с этих позиций пригодными для промышленного применения, 41,1% штаммов находятся на грани риска применения и 20,1% штаммов не рекомендуются для использования в биотехнологическом производстве. Проведенные исследования позволили установить, что патогенные свойства штаммов микроорганизмов одного рода и даже вида могут значительно отличаться, что подтверждает необходимость изучения патогенных свойств каждого биотехнологического штамма.

Большинство изученных штаммов родов *Bacillus* (76,4%), *Brevibacterium* (84,2%) и *Micrococcus* (100%) являлись непатогенными и с этих позиций пригодными для промышленного применения. Все микроорганизмы родов *Corynebacterium* и *Moraxella* следует расценивать как патогенные и опасные для промышленного применения. Представители родов *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus* и *Pseudomonas* имели показатели патогенных свойств, количественно соответствующие условно патогенным микроорганизмам (табл. 2).

Таблица 3 / Table 3

**Показатели патогенных свойств штаммов микроорганизмов, входящих в биопрепараты различного назначения**  
**Indicators of pathogenic properties of microorganisms strains included in biological preparations for various purposes**

Препарат Preparations	Микроорганизмы Microbes	LD <sub>50</sub> , КОЕ/жив. (CFU/animal)	Lim <sub>пат.</sub> , КОЕ/жив. (CFU/animal)	Доза, КОЕ/жив.; сроки высевания, сут Dose, CFU/animal, sowing time, days
Кормовая добавка для животных «Муцинол» Feed additive for animals Mucinol	<i>Bacillus licheniformis</i>	$> 8 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^{7-10}$ ; 3, 8, 15
	<i>Bacillus subtilis</i>	$> 10^{11}$	$10^9$	$10^{8-11}$ ; 3, 8, 15
Биологический препарат «Фитоспорин» на основе природного микроорганизма Microbiological fertilizer Fitosporin	<i>Bacillus subtilis</i> (9 штаммов/ 9 strains)	$> 10^{10}$	$10^8$	$10^{8-11}$ ; 2, 3, 6
Микробиологическое удобрение Microbiological fertilizer	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	$> 1.2 \cdot 10^{10}$	$1.2 \cdot 10^8$	$10^{10-8}$ ; 2, 5
Микробиологический инсектицид «ТуринБаш» Microbiological insecticide TurinBash	<i>Bacillus thuringiensis subsp. aizawai</i>	$> 10^{10}$	$10^8$	$10^{10-9}$ ; 2, 5, 8
	<i>Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis</i>	$> 1.8 \cdot 10^{10}$	$1.8 \cdot 10^8$	$10^{10-8}$ ; 2, 5
Биопрепарат-деструктор нефти Biological oil destructor	<i>Arthrobacter</i> spp.	$> 8 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^{7-8}$ ; 2, 3
	<i>Bacillus atrophaeus</i>	$> 10^9$	$10^8$	$10^{8-9}$ ; 2, 4
	<i>Bacillus megaterium</i>	$> 10^9$	$10^8$	$10^{8-9}$ ; 2, 4
	<i>Pseudomonas putida</i>	$> 8 \cdot 10^8$	$8 \cdot 10^7$	$10^{7-9}$ ; 2, 4
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	$> 2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$10^{8-9}$ ; 2, 4

На следующем этапе исследований были изучены патогенные свойства штаммов бактерий, используемых в народном хозяйстве в качестве активной субстанции современных микробиологических препаратов. Для микроорганизмов *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*, входящих в кормовую добавку для животных «Муцинол», пороговая доза составила  $10^9$  и  $8 \cdot 10^9$  КОЕ/жив. соответственно, а высевание бактерий из органов (печень, почки, режеселезёнка) происходило в течение 15 сут. Для бактерий *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aureofaciens*, используемых в качестве микробиологических удобрений, пороговая доза определена на уровне  $10^8$  КОЕ/жив., а высевание штаммов из органов наблюдалось лишь в течение 5–6 сут. Биопрепарат-инсектицид «ТуринБаш» имеет в составе бактерии *Bacillus thuringiensis subsp. aizawai* и *Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis*, пороговая доза которых составила  $10^8$  КОЕ/жив., а высевание штаммов наблюдалось кратковременно в течение 5–8 сут. В состав биопрепарата-деструктора нефтяных загрязнений входит консорциум штаммов из пяти бактерий. Пороговая доза одного из них, *Rhodococcus erythropolis*, составила  $2 \cdot 10^9$  КОЕ/жив., для *Arthrobacter* spp., *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus megaterium* пороговая доза определена на уровне  $10^8$  КОЕ/жив., а для грамотрицательной бактерии *Pseudomonas putida* она составила  $8 \cdot 10^7$  КОЕ/жив. Все штаммы персистируют во внутренних органах в течение нескольких дней (табл. 3). Токсигенность всех изученных штаммов отсутствовала. При внутрибрюшинном введении высоких доз микроорганизмов гибели животных не наблюдалось.

Результаты исследования подтверждают, что в состав современных микробиологических препаратов входят исключительно сапрофитные микроорганизмы. Они, как правило, или выделены из объектов окружающей среды (почва, вода), или получены путём ступенчатой селекции от своих предшественников, но обладают более выраженными полезными свойствами в направлении целевого объекта по сравнению с исходными.

## Обсуждение

Потенциальная опасность вредного воздействия на здоровье людей биотехнологических микроорганизмов требует разработки количественных критериев комплексной оценки

патогенных свойств штаммов, предлагаемых для использования в биотехнологиях.

К началу исследований эта задача ещё не была решена, и авторы изучили показатели патогенности 33 штаммов, принадлежащих к сапрофитным, условно патогенным и патогенным микроорганизмам. Представленные данные являются итогом многолетних оригинальных исследований, проведённых преподавателями и научными сотрудниками кафедры гигиены РНИМУ им. Н.И. Пирогова. В результате были получены количественные значения критериев патогенности различных групп микроорганизмов и показано, что патогенные свойства предлагаемых для промышленного использования штаммов микроорганизмов одного рода и даже вида могут существенно отличаться, что ещё раз подтверждает необходимость проведения их первичной санитарно-гигиенической оценки [14].

При изучении большого массива коллекционных штаммов (около 250), планируемых для биотехнологических целей, установлено, что все штаммы микроорганизмов родов *Corinebacterium* и *Moraxella* являются патогенными и с этой позиции не могут использоваться для промышленного применения.

Микроорганизмы родов *Enterobacter*, *Haemophilus*, *Acinetobacter* и *Escherichia* относятся к условно патогенным, а большинство микроорганизмов родов *Bacillus* (76,4%), *Brevibacterium* (84,2%) и *Micrococcus* (100%) не патогенны и могут быть рекомендованы к использованию в биотехнологиях.

Все испытанные современные микробиологические препараты, используемые в народном хозяйстве, содержат только сапрофитные штаммы, если рассматривать их с позиции разработанных критериев патогенных свойств микроорганизмов, являющихся активной субстанцией этих препаратов.

Вместе с тем разработка и апробирование критериев первичной санитарно-гигиенической оценки микроорганизмов, предлагаемых для биотехнологий, проведены на большом материале (более 250 штаммов) только при однократном воздействии высоких доз и ориентированы в первую очередь на исследование вирулентных свойств без учёта длительного воздействия в реальных условиях производства и использования. Это не позволило оценить специфические эффекты воздействия штаммов и может стать направлением дальнейших исследований.



Обеспечение биобезопасности биотехнологических штаммов предполагает выявление специфического воздействия непатогенных микроорганизмов и биопрепаратов на их основе на иммунную систему (иммуномодулирующее, сенсibiliзирующее действие) и состояние микроценоза в субхроническом эксперименте с целью экспериментального обоснования предельно допустимых концентраций и регламентации биотехнологических штаммов и содержащих их биопрепаратов в объектах окружающей среды.

## Заключение

1. Первичная санитарно-гигиеническая оценка штаммов, предлагаемых для использования в биотехнологиях, осуществляется посредством изучения комплекса показателей патогенности: полулетальной дозы ( $LD_{50}$ ), диссеминации штаммов во внутренних органах экспериментальных животных, пороговой дозы ( $Lim_{bact}$ ), токсигенности и ферментов патогенности.

2. Все планируемые для биотехнологического использования микроорганизмы должны проходить санитарно-гигиеническую оценку, поскольку патогенные свойства штаммов одного рода и даже вида могут существенно различаться.

3. В отношении проявления или отсутствия патогенных свойств исследованные микроорганизмы можно разделить на три группы: рекомендуемые к использованию в биотехнологиях (*Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*); находящиеся на грани риска (*Enterobacter*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*); не рекомендуемые к использованию в биотехнологических целях (*Corinebacterium* и *Moraxella*).

4. При исследовании возможных патогенных свойств бактерий, входящих в качестве активной субстанции в состав используемых в народном хозяйстве микробиологических препаратов, установлено, что эти микроорганизмы относятся исключительно к сапрофитным штаммам.

## Литература

(п.п. 1–8 см. References)

- Чиркина Т.М., Махонько М.Н., Шкробова Н.В. Заболевания, обусловленные воздействием антибиотиков в условиях современного производства. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2013; 3(11): 1161–3.
- Шевляков В.В., Филонок В.А., Рыбина Т.Н., Чернышова Е.В., Кардаш О.Ф., Эрм Г.И. и др. Состояние здоровья работников биотехнологических производств. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2014; 13(3): 127–38.
- Дмитриева Л.Б., Лавер Б.И., Родионова О.М. Сравнительная оценка частоты вагинальных кандидозов у женщин, работающих в производстве фармацевтических препаратов и антибиотиков. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности*. 2004; (1): 141–4.
- Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Посоюзных О.В., Ташланова В.В., Карпукхина Н.Ф., Колотова О.Н. и др. К вопросу распространения бактерий рода *Aeromonas* в объектах окружающей среды и клиническом материале. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНУСО*. 2018; (6): 54–7.
- Егорова О.Н., Брусина Е.Б., Григорьев Е.В. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции: Федеральные клинические рекомендации. М.; 2014.
- Королик В.В. *Комплексная гигиеническая оценка биотехнологических штаммов микроорганизмов, в связи с загрязнением ими окружающей среды*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 1999.
- González D., Probanza M.A., Jiménez P.A. Selection of mercury-resistant PGPR strains using the BMRSI for bioremediation purposes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021; 18(18): 9867. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189867>
- Mitra S., Das A., Sen S., Mahanty B. Potential of metabolic engineering in bacterial nanosilver synthesis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 34(9): 138. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2522-8>
- Voulgaridou G.P., Mantso T., Anestopoulos I., Klavaris A., Katzastra C., Kiouisi D.E., et al. Toxicity profiling of biosurfactants produced by novel marine bacterial strains. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(5): 2383. <https://doi.org/10.3390/ijms22052383>
- Khan M.A., Hamayun M., Asaf S., Khan M., Yun B.W., Kang S.M., et al. Rhizospheric *Bacillus* spp. rescues plant growth under salinity stress via regulating gene expression, endogenous hormones, and antioxidant system of *Oryza sativa* L. *Front. Plant Sci.* 2021; 12: 665590. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.665590>
- Donohue D.C. Safety of probiotics. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2006; 15(4): 563–9.
- Vesterlund S., Vankerckhoven V., Saxelin M., Goossens H., Salminen S., Ouwehand A.C. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 116(3): 325–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.002>
- Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guéguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 2008; 126(3): 278–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015>
- Stavropoulou E., Emonet S. Probiotics: benefits and harms. *Rev. Med. Suisse*. 2020; 16(710): 1916–9. (in French)
- Chirkina T.M., Makhon'ko M.N., Shkrubova N.V. Diseases caused by exposure to antibiotics in modern industrial conditions. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy*. 2013; 3(11): 1161–3. (in Russian)
- Shevlyakov V.V., Filonyuk V.A., Rybina T.N., Chernyshova E.V., Kardash O.F., Erm G.I., et al. The state of health of workers in biotechnological productions. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2014; 13(3): 127–38. (in Russian)
- Dmitrieva L.B., Laver B.I., Rodionova O.M. Comparative estimation of vaginal candidosis frequency among women working in pharmaceutical medicines and antibiotics industry. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti*. 2004; (1): 141–4. (in Russian)
- Kataeva L.V., Stepanova T.F., Posoyuznykh O.V., Tashlanova V.V., Karpukhina N.F., Kolotova O.N., et al. On the issue of the spread of *Aeromonas* bacteria in the environment and clinical material. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya – ZNiSO*. 2018; (6): 54–7. (in Russian)
- Egorova O.N., Brusina E.B., Grigor'ev E.V. Epidemiology and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Federal clinical guidelines. Moscow; 2014. (in Russian)
- Korolik V.V. *Comprehensive hygienic assessment of biotechnological strains of microorganisms, in connection with their environmental pollution*: Diss. Moscow; 1999. (in Russian)

## References