

**Шейна Н.И.**

Российский государственный национальный исследовательский  
медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
E-mail: ni\_sheina@mail.ru

## **КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ БИОБЕЗОПАСНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

**Проведена оценка биобезопасности микроорганизмов на основе изучения патогенности и характера неблагоприятного действия 29 биотехнологических штаммов. Выявлена зависимость выраженности иммунотропного, сенсибилизирующего и дисбиотического эффектов от таксономического положения микроорганизмов. Предложена гигиеническая классификация микроорганизмов по степени опасности воздействия на организм и унифицирована с рекомендациями международных организаций.**

**Ключевые слова:** биобезопасность, микроорганизмы, патогенность, нормирование.

Проблема безопасности микроорганизмов в биотехнологической промышленности является актуальной вследствие расширения номенклатуры используемых штаммов. В широком понимании биологическая безопасность включает в себя предотвращение потенциальной опасности биологического агента, в том числе и микроорганизмов, используемых в биотехнологиях.

Введение уровней биобезопасности для промышленных штаммов связано с более общей проблемой – необходимостью разработки современной нормативной базы сертификации и стандартизации промышленных штаммов, обеспечения контроля за использованием их в производстве, а также создания механизма ее реализации, концептуально согласующихся с мировой практикой в этой области.

Национальным институтом здоровья (США), Европейской федерацией биотехнологии и OECD (Organization of economical cooperation & development) разработана классификация микроорганизмов по степени риска, определяемой на основании таксономического положения и возможных патогенных свойств штамма. Согласно этой классификации микроорганизмы, используемые в биотехнологии, подразделяют на 4 класса – безвредные, мало опасные, умеренно опасные и высоко опасные микроорганизмы.

В России развитие системы безопасности биотехнологических штаммов тесно связано с их гигиеническим нормированием, которое базируется на экспериментальном определении минимально действующих концентраций загрязнителя и установлении предельно допустимой концентрации (ПДК).

Целью работы явилось обоснование критериев биобезопасности биотехнологических штаммов, принадлежащих к различным таксонам на основе изучения характера их неблагоприятного действия в эксперименте.

### **Программа и методы исследования**

Исследование возможных патогенных свойств новых биотехнологических штаммов при однократном внутрибрюшинном введении больших доз микроорганизмов проводили по интегральным показателям, характеризующим взаимоотношения между макро- и микроорганизмом: вирулентность, скорость проникновения («пороговая» доза) в кровь и диссеминация во внутренние органы (почки, печень, селезенка), токсигенность экзо- и эндотоксинов [1].

Были изучены возможные патогенные свойства следующих микроорганизмов: *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.thuringiensis v. israelensis*, *R.corallinus*, *R.erythropolis*, *A.terreus*, *P.canescens*, *Tolypocladium cylindrosporum*, *Candida marxianus*, *A.denitrificans*, *Alcaligenes monasteriensis*, несколько штаммов *E.coli*.

При повторном (в течение 1 месяца) интраназальном введении суспензии штаммов были исследованы общетоксическое действие (динамика массы тела, анализ состава периферической крови, показатели функционального состояния нервной системы, почек, печени), иммунотропные свойства (показатели клеточного звена иммунной системы, антигенность иммуномодулирующий и сенсибилизирующий эффекты) и дисбиотический эффект (количественная и качественная характеристика аутофлоры кишечника). В процессе работы были изучены 29 штам-

мов, принадлежащих к различным таксономическим группам – грамположительные и грамотрицательные бактерии, актиномицеты, плесневые и дрожжеподобные грибы [2].

**Результаты и их обсуждение**

При изучении патогенности показано, что средневирulentная доза для всех микроорганизмов была выше  $10^{11}$  кл/жив., т. е. при введении изученных доз гибели животных не наблюдалось (табл. 1).

При введении суспензии грамположительных бактерий и нокардиоформных актиномицетов «пороговая» доза находилась на достаточно высоком уровне: микроорганизмы высевались из крови через 30 мин после их введения в дозах  $10^{11}$ ,  $10^{10}$  и  $10^9$  кл/жив. Указанный факт характеризует их низкие инвазивные свойства. При изучении диссеминации они высевались из крови и внутренних органов (почки, селезенка) в основном на 2-й день. Отдельные штаммы в единичных колониях определялись на 4–6-й день после введения.

Введение микроскопических грибов свидетельствует также о невысокой инвазивности. Микромицеты высевались из крови через 30 мин после введения в дозах  $10^{10}$  и  $10^9$  кл/жив. Длительность персистирования в организме по результатам диссеминации составляла 2, максимум 5 дней.

Для введения грамотрицательных бактерий характерны более низкие «пороговые» дозы, пределы их находились между  $10^9$  и  $10^8$  кл/жив. Это свидетельствует о более высоких инвазивных свойствах грамотрицательных бактерий. При определении диссеминации длительность высеваания их из крови и внутренних органов теплокровных животных составляла от 2 до 8 дней.

Экспериментальные исследования по оценке патогенных свойств микроорганизмов различных таксонов показали, что большинство штаммов, предлагаемых для использования в биотехнологической промышленности, не обладают вирулентностью, токсигенностью и токсичностью. Инвазивная способность этих штаммов невысока, они не размножаются в организме теплокровных животных, пребывание их ограничивается несколькими днями.

Полученные факты свидетельствуют об отсутствии патогенных свойств у изученных микроорганизмов и о возможности их использования в биотехнологиях. Вместе с тем для обоснования их биобезопасности рекомендуется исследование характера неблагоприятного действия в длительном эксперименте и разработка гигиенических нормативов – ПДК [3, 4].

Как показали проведенные исследования, основными неблагоприятными эффектами промышленных микроорганизмов являются иммунотропный, включая сенсибилизирующий эффект и оценку клеточного звена иммунной системы, а также изменение микроэкологии кишечника [5–10]. Проявление этих эффектов зависит от таксономической характеристики штамма.

В таблице 2 приведены данные об иммунотропной и сенсибилизирующей активности отдельных штаммов, наиболее характерных для каждой группы микроорганизмов.

Было показано, что грамположительные бактерии, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Propionibacterim*, *Brevibacterim*, и нокардиоформные актиномицеты (***Rhodococcus***) не обладают иммунотропными и дисбиотическими свойствами при воздействии даже высоких концентраций ( $10^{6-8}$  кл/м<sup>3</sup>).

Таблица 1. Показатели патогенности биотехнологических штаммов микроорганизмов при однократном внутрибрюшинном введении

Промышленные микроорганизмы	DV <sub>50</sub> , кл/жив	«Пороговая» доза, кл/жив	Диссеминация		
			сроки высева, сут.	min доза, кл/жив	орган-мишень
<b>Микромицеты</b> <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Tolypocladium</i> , <i>Candida</i>	$>10^{9-12}$	$10^{9-10}$	2	$10^{9-11}$	Кровь, почки, селезенка
<b>Грамположительные бактерии</b> ( <i>Bacillus</i> ), <b>нокардиоформные</b> актиномицеты ( <i>Rhodococcus</i> )	$>10^{10-12}$	$10^{9-11}$	2	$10^{9-11}$	Кровь, почки, селезенка, печень
<b>Грамотрицательные бактерии</b> <i>Alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>E.coli</i>	$10^{10-12}$	$10^{8-9}$	2,5	$10^{8-10}$	Кровь, почки, селезенка

Другие микроорганизмы, относящиеся к грамположительным бактериям (*Bacillus*) и актиномецетам (*Streptomyces*, *Actinomyces*), оказывают слабое иммуностропное, сенсибилизирующее и дисбиотическое действие на организм в концентрации  $10^{4-6}$  кл/м<sup>3</sup>.

Наиболее выраженными иммуностропными, в том числе сенсибилизирующими, и дисбиотическими свойствами обладают грамотрицательные бактерии (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*), а также плесневые (*Aspergillus*, *Penicillium*) и дрожжеподобные грибы (*Candida*). Минимальные изменения иммунного статуса и микроэкологии кишечника наблюдаются уже при интраназальном воздействии их в концентрации  $10^3$  и  $10^4$  кл/м<sup>3</sup>.

Отмечено снижение Т-лимфоцитов и увеличение В-лимфоцитов, а также существенное изменение баланса Т- и В-лимфоцитов периферической крови. Величина показателя Т/В при воздействии *A. awamori* в концентрации  $10^5$  кл/м<sup>3</sup> снижена до 0,97 (в контроле 2.1). При воздействии дрожжеподобного гриба *Candida* в концентрации  $3 \times 10^4$  кл/м<sup>3</sup> отмечено снижение коэффициентов массы иммунокомпетентных органов (тимус и селезенка).

Показано развитие гиперчувствительности немедленного и замедленного типа у животных при воздействии грибов и грамотрицательных бактерий в концентрации  $10^4$  и  $10^5$  кл/м<sup>3</sup> (табл. 2).

В плане развития нарушений микроэкологического равновесия биотехнологические штаммы проявляли также различную активность.

Штаммы, принадлежащие к группе нокардиоформных актиномицетов, не вызывали каких-либо изменений микрофлоры при воздействии на уровне  $10^4 - 10^7$  кл/м<sup>3</sup>. Группы грамположительных бактерий (палочки, кокки, споробразующие и неспоробразующие), как правило, вызывают минимальные изменения микробного пейзажа (изменение содержания *E.coli* и энтеробактерий) на уровне  $5 \times 10^5$  кл/м<sup>3</sup> и выше.

Среди бактерий потенциально опасной в плане нарушений микроэкологии кишечника является группа грамотрицательных палочек и кокков (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*). При этом снижается количество лактозопозитивной и увеличивается число лактозонегативной *E.coli*, отмечается большее число грамположительной микрофлоры (энтеробактерии, стафилококки, стрептококки). Подобные изменения наблюдаются

Таблица 2. Характеристика иммуностропной и сенсибилизирующей активности промышленных микроорганизмов при ингаляционном воздействии

Концентрация, кл/м <sup>3</sup>	Т-лимфоциты, %	В-лимфоциты, %	ГНТ, %	ГЗТ, мм
<i>Rhodococcus erythropolis</i>				
Контроль	44,2±1,5	17,8±1,5	4,7±1,2	0,142±0,007
$5 \times 10^7$	39,6±2,3	20,2±1,4	5,7±1,0	0,151±0,010
<i>Bacillus licheniformis</i> 60				
Контроль	44,0±1,1	21,8±0,9	4,6±0,4	0,12±0,03
$5 \times 10^4$	45,5±1,5	20,4±1,0	4,4±0,5	0,22±0,03
$5 \times 10^5$	39,1±1,0*	25,4±1,7	9,0±0,9**	0,38±0,02**
<i>Pseudomonas caryophyllii</i>				
Контроль	43,9±2,0	18,4±2,3	4,0±0,9	0,139±0,021
$7 \times 10^3$	40,5±2,1	18,9±2,1	6,1±1,6	0,233±0,064
$7 \times 10^4$	33,2±1,9**	22,5±1,7*	12,6±2,4**	0,403±0,034*
<i>Penicillium canescens</i>				
Контроль	41,6±0,8	21,1±0,8	3,5±0,6	0,19±0,03
$2 \times 10^3$	39,8±0,4	22,2±1,8	4,2±0,5	0,24±0,04
$2 \times 10^4$	36,3±1,2*	27,0±1,4*	12,5±2,7**	0,36±0,04*
<i>Aspergillus awamori</i>				
Контроль	43,5±2,3	21,0±1,1	4,4±0,4	0,188±0,018
$1,2 \times 10^4$	32,2±1,7**	24,6±0,9	11,0±1,1**	0,138±0,028
$1,2 \times 10^5$	29,6±3,5**	30,4±1,4**	24,4±2,7**	0,306±0,044*
<i>Candida tropicalis</i>				
Контроль	42,2±2,6	19,5±1,6	4,7±0,4	,201±0,045
$3 \times 10^3$	38,7±1,7	25,5±1,7*	11,2±1,8**	0,436±0,061*
$3 \times 10^4$	35,5±1,7	31,3±2,1**	20,0±3,3**	0,490±0,051*

Обозначения: \* P<0,05, \*\* P<0,01

при воздействии промышленных микроорганизмов на уровне  $5 \times 10^4$  кл/м<sup>3</sup> и характеризуют умеренно выраженный дисбактериоз.

При воздействии плесневых грибов *A. awamori* и *P. funiculosum* на уровне  $2 \times 10^4$  кл/м<sup>3</sup> наблюдали выраженные изменения, характеризующие выраженный или умеренно выраженный дисбактериоз (увеличение условнопатогенной микрофлоры, включая протей, и снижение содержания облигатной микрофлоры).

Наиболее сильные изменения микроценоза были отмечены при воздействии дрожжеподобных грибов рода *Candida* на уровне  $10^3$ – $10^4$  кл/м<sup>3</sup>. Характер наблюдаемых изменений (снижение содержания кишечных палочек и лактобацилл, увеличение содержания стафилококков и стрептококков) позволил характеризовать их как выраженный дисбактериоз.

На основании определения патогенных свойств в однократных опытах, а также изучения вредных эффектов (сенсibiliзирующий, иммунотропный, дисбиотический) при повторном ингаляционном воздействии предложена классификация микроорганизмов по степени опасности (табл. 3).

Микроорганизмы делятся на 4 класса (особо опасные, опасные, умеренно и мало опасные микроорганизмы). Для каждого класса микроорганизмов рекомендованы соответствующие требования биобезопасности как в лабораторных условиях, так и в производственных биотехнологических процессах.

В целом российская классификация находится в гармоничном соответствии с международной классификацией микроорганизмов по степени риска. Однако она является более обоснованной и надежной, т. к. не ограничивается только таксономической характеристикой и оценкой патогенности, а предполагает изучение особенностей действия штаммов на организм в длительном эксперименте.

Таблица 3. Гигиеническая классификация микроорганизмов по степени опасности воздействия на организм

Показатели	1 класс	2 класс	3 класс	4 класс
ПДК <sub>р.з.</sub> , кл/м <sup>3</sup>	Не рекомендуются к использованию в биотехнологической промышленности		$\leq 5 \times 10^3$	$> 5 \times 10^3$
ПДК <sub>а.в.</sub> , кл/м <sup>3</sup>			$\leq 5 \times 10^2$	$> 5 \times 10^2$
Lim <sub>ch sens</sub> , кл/м <sup>3</sup>			$\leq 5 \times 10^4$	$> 5 \times 10^4$
Lim <sub>ch imm</sub> , кл/м <sup>3</sup>			$\leq 5 \times 10^4$	$> 5 \times 10^4$
Lim <sub>ch dis</sub> , кл/м <sup>3</sup>			$\leq 5 \times 10^5$	$> 5 \times 10^5$
<b>Показатели патогенности</b>				
– пороговая доза, кл/жив.	$\leq 10^7$		$> 10^7$	
– минимальная доза высевания, кл/жив.	$\leq 10^7$		$> 10^7$	
– диссеминация в кровь и органы, дни	Диссеминация 1–30 дней		Персистирование 1–15 дней	

Обозначения:

- 1 класс – особо опасные инфекции;
- 2 класс – опасные микроорганизмы, возбудители других инфекционных заболеваний;
- 3 класс – умеренно опасные микроорганизмы;
- 4 класс – мало опасные микроорганизмы;
- ПДК<sub>р.з.</sub> – предельно допустимая концентрация в воздухе рабочей зоны;
- ПДК<sub>а.в.</sub> – предельно допустимая концентрация в атмосферном воздухе населенных мест;
- Lim<sub>ch sens</sub> – порог хронического действия по сенсibiliзирующему эффекту;
- Lim<sub>ch imm</sub> – порог хронического действия по иммунотропному эффекту;
- Lim<sub>ch dis</sub> – порог хронического действия по дисбиотическому эффекту.

Таким образом, на современном этапе развития и совершенствования критериев биобезопасности биотехнологических штаммов однозначно показано, что обязательным и необходимым условием допуска штаммов-продуцентов к промышленному применению является их авирулентность, низкая инвазивность, отсутствие токсигенности и способности диссеминировать во внутренних органах. Иначе говоря, если штамм квалифицируется как непатогенный, он может использоваться в биотехнологической промышленности.

В дальнейшем выявление влияния неблагоприятных эффектов микроорганизмов на организм при длительной экспозиции на основе количественных критериев оценки иммунотропного, сенсibiliзирующего и дисбиотического действия позволит определить класс опасности штамма и рекомендовать необходимые требования безопасности.

11.05.2012

**Список литературы:**

1. Пивоваров Ю.П., Мясина Л.И., Королик В.В. Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза. Методические рекомендации. – М., 1992. – 20 с.
2. Постановка исследований для обоснования предельно допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны. Методические указания. – М., МЗ СССР, 1983. – №2955-83. – 16 с.

3. Рахманин Ю.А., Багдасарьян Г.А., Немыря В.И., Сергеюк Н.П. Принципиальные подходы к нормированию биологических загрязнений // Гигиена и санитария. – 2001. – №1. – С. 12–15.
4. Сергеюк, Н.П. Научные основы оценки опасности и гигиенической регламентации промышленных микроорганизмов: Дисс. д. м. н. – М., 2004. – 240 с.
5. Скрыбина Э.Г., Шейна Н.И. Экспериментальная оценка иммуотропной активности промышленных микроорганизмов // Russian J. of Immunology. – 2004. – V. 9. – suppl. Объединенный иммунологический форум. – Р. 123.
6. Шейна, Н.И. Гигиенические аспекты изучения характера биологического действия промышленных микроорганизмов // Материалы IY Всероссийского конгресса «Профессия и здоровье». – М., 25–27 октября 2005. – С. 164–165.
7. Шейна, Н.И. Токсиколого-гигиеническая оценка биотехнологических штаммов микроорганизмов // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2007. – №3 (56). – С. 66–71.
8. Шейна, Н.И. Критерии дисбаланса микроэкологии кишечника в системе гигиенического нормирования и оценки риска воздействия промышленных микроорганизмов // Медицина труда и промышленная экология. – 2007. – № 11. – С. 21–26.
9. Шейна Н.И., Е.В. Буданова Оценка микроэкологического дисбаланса кишечника животных при воздействии промышленных микроорганизмов в токсиколого-гигиенических исследованиях // Токсикологический вестник. – 2005. – №5. – С. 23–27.
10. Шейна Н.И., Скрыбина Э.Г., Иванов Н.Г. Сравнительная характеристика иммуотропной активности промышленных микроорганизмов при гигиеническом нормировании // Токсикологический вестник. – 2005. – №3. – С. 12–15.

Сведения об авторе:

**Шейна Наталья Ивановна**, главный научный сотрудник отдела токсикологии  
Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова  
Минздравсоцразвития РФ, г. Москва, доктор биологических наук, доцент  
117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, отдел токсикологии, тел. (495) 4340232,  
e-mail: ni\_sheina@mail.ru

**UDC 613.636:616:576.0.06**

**Sheina N.I.**

The Russian national research medical university named after N.I. Pirogov (RNRMU), e-mail: ni\_sheina@mail.ru  
**BIOSAFETY EVALUATION CRITERIA OF MICROORGANISMS USED IN THE BIOTECHNOLOGY INDUSTRY**  
Biosafety assessment based on the study of microbial pathogenicity and adverse action of 29 biotech strains was conducted. The dependence of the intensity immunotropic, and dysbiotic sensitive effects of the taxonomic position of microorganisms has been found. Sanitary classification of microorganisms in the degree of hazard effects was proposed and unified with the recommendations of international organizations.

Key words: biosafety, microorganisms, pathogenicity, regulation.