



СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА О ГИГИЕНИЧЕСКОМ РЕГЛАМЕНТИРОВАНИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Ю. П. Пивоваров, В. В. Королик

В работе впервые определены количественные критерии и схема первичной санитарно-гигиенической оценки патогенных свойств штаммов, предлагаемых для использования в биотехнологии. Получены результаты, доказывающие негативное воздействие биотехнологических штаммов на биоценоз и процессы самоочищения воды водоемов и почвы. Дано деление производственных штаммов на группы по выраженности их патогенных свойств и степени воздействия на объекты окружающей среды. Обоснована необходимость комплексных гигиенических исследований при регламентировании промышленных микроорганизмов в окружающей среде. Даны основные этапы исследований при разработке гигиенических регламентов содержания биотехнологических штаммов в окружающей среде.

Достижения современной науки открыли новые возможности широкого использования микроорганизмов в народном хозяйстве. В медицинской промышленности - это биосинтез аминокислот, антибиотиков, ферментов, вакцинных и целого ряда других препаратов; в сельском хозяйстве - биологические средства защиты растений, белково-витаминные концентраты, кормовые дрожжи, ветеринарные фармацевтические препараты и т.д.; в пищевой промышленности - переработка пищевых продуктов, использование микроорганизмов в приготовлении ряда продуктов питания; в области охраны окружающей среды - переработка отходов различных отраслей промышленности, исключение применения ядохимикатов.

В связи с развитием биотехнологии возрастает роль биологического компонента загрязнения окружающей среды, который включает в себя промышленные микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности, способные оказывать прямое или косвенное воздействие на здоровье человека. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что производимые и применяемые микробные препараты при определенных условиях могут вызывать у человека пищевые отравления, различные аллергические заболевания, заболевания кожи. Взрослые люди и, особенно, дети в несколько раз чаще болеют ларинготрахеитами, пневмониями, ангинами и отитами в случаях проживания в районах расположения биотехнологических производств.

Доказано, что воздушные выбросы и сточные воды предприятий биотехнологии, а также применение микробиологических средств защиты растений являются мощным источником поступления микроорганизмов-продуцентов в окружающую среду: атмосферный воздух, водные объекты, почву, растительные

продукты питания. В результате наблюдается значительное загрязнение всех объектов окружающей среды, в связи с чем может произойти нарушение микробиоценозов, процессов самоочищения, увеличение сроков выживания патогенных микроорганизмов в воздухе, воде и почве. Все это способно повлечь негативные эпидемиологические и экологические последствия.

Указанные обстоятельства выдвигают в качестве чрезвычайно важной проблемы гигиеническое нормирование микроорганизмов-продуцентов в различных объектах окружающей среды.

Многое в этом направлении уже достигнуто. По мнению ряда исследователей нормированию подлежат штаммы промышленных микроорганизмов, прошедшие первичную санитарно-гигиеническую оценку патогенных свойств с использованием наиболее доступных методов исследования. Соответствующие методические рекомендации на основании многолетних исследований разработаны нами [1]. Согласно этому документу, первичная гигиеническая оценка микроорганизмов-продуцентов заключается в следующем.

Первый этап исследований - постановка эксперимента на животных с определением средневирulentной дозы, диссеминации штаммов во внутренних органах экспериментальных животных, определения «пороговой» дозы и токсичности. В случае установления хотя бы одного из перечисленных показателей в определенных количественных значениях, исследования можно закончить на этом этапе. Такие штаммы следует отнести к группе микроорганизмов, не рекомендуемых к использованию на предприятиях биотехнологии.

В противном случае, необходимо перейти ко второму этапу исследований, включающему определение «ферментов патогенности». Для этого количественно изучается гиалуронидазная активность, определение гемолизина, желатиназной, лецитиназной и декарбоксилазной активности штаммов. На основании полученных данных и разработанных количественных критериев решается вопрос о возможности применения микроорганизмов в биотехнологии. В соответствии с критериями оценки патогенных свойств все штаммы-продуценты делятся на три группы:

- штаммы, не рекомендуемые к использованию;
- штаммы, находящиеся на грани риска их применения;
- штаммы, рекомендуемые к промышленному применению.

Подходы к нормированию остаточных количеств микробных инсектицидов в продуктах питания разработаны в ряде исследований [2 - 4]. Эти подходы существенно отличаются от таковых при нормировании химических веществ, поскольку показатели токсичности не являются критериями вредности данных препаратов. Определяющими здесь служат патогенность микроорганизмов, входящих в препарат и их антагонистическое действие по отношению к нормальной микрофлоре; выживаемость этих микроорганизмов в процессе кулинарно-технологической обработки продуктов, а также их размножение в готовых продуктах при различном температурном режиме хранения в зависимости от массивности обсеменения растительного сырья, вида растительного продукта, характера кулинарной обработки.

Принципы гигиенического нормирования микробных препаратов в воздухе рабочей зоны также сформулированы и основаны на определении патогенности микробного аэрозоля, видовой чувствительности макроорганизма к исследуемым штаммам, выживаемости последних в воздухе. Методы исследования патогенных свойств, обоснование ПДК промышленных микроорганизмов в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе изложены в соответствующих методических указаниях [5].

Наименее изученными вопросами являются вопросы гигиенического нормирования штаммов-продуцентов в воде водоемов и в почве. К нормированию микроорганизмов-продуцентов, по нашему мнению, следует подходить комплексно. Основными этапами исследований должны быть: определение патогенных свойств микроорганизмов-продуцентов, их выживаемость в воде и почве, влияние на микробиоценоз и процессы самоочищения этих объектов.

Учитывая качественное отличие изучаемых агентов (живые клетки),

принципы их гигиенического нормирования существенно отличаются от таковых, используемых при обосновании ОБУВ и ПДК химических вредных веществ, в том числе продуктов микробиологического синтеза (кормовых белков, аминокислот и др.). Так, по мнению многих исследователей, показателями опасности действия непатогенных (не вызывающих у человека инфекционных процессов) микроорганизмов-продуцентов является транзитное бациллоносительство (диссеминация во внутренних органах), а также специфическое влияние на иммунную систему (иммунотоксичность) и на нормальную микрофлору макроорганизма (дисбиотическое действие) [4,5]. В соответствии с этими положениями предлагается следующая схема исследований: проведение хронического эксперимента для выявления лимитирующего критерия вредности (иммунотоксического, дисбиотического или по диссеминации микроорганизма во внутренних органах). На основании полученных данных устанавливают порог хронического действия.

Следующим необходимым этапом работы являются исследования по изучению воздействия микроорганизмов-продуцентов на микробиоценоз и процессы самоочищения воды водоемов и почвы. Этому вопросу были также посвящены настоящие исследования.

Основным этапом в изучении воздействия микроорганизмов-продуцентов на микробиоценоз и процессы самоочищения воды водоемов и почвы было моделирование условий, максимально приближенных к естественному протеканию этих процессов в природных условиях. В эксперимент были взяты штаммы-продуценты, относящиеся к различным таксономическим группам: спорообразующие бактерии, неспорообразующие бактерии и грибы. В задачу исследования входило изучение воздействия штаммов-продуцентов, в условиях однократного и многократного загрязнения воды и почвы, на следующие объекты:

- микроорганизмы, которые являются основными участниками процессов самоочищения воды и почвы от органического и микробного загрязнения;
- микроорганизмы, которые используются в качестве показателей оценки качества воды и почвы в отношении эпидемической опасности;
- химические показатели самоочищения воды и почвы.

В отношении воды водоемов целесообразно изучение влияния штаммов-продуцентов на обитателей водоемов. В соответствии с этим, воздействие микроорганизмов-продуцентов на процессы самоочищения, водный микробиоценоз и сроки выживания в воде патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов определялось с помощью учета следующих показателей:

- идентификация до родов и количественный учет сапрофитных микроорганизмов, выделенных из воды;
- определение числа сапрофитных микроорганизмов;
- определение числа лактозоположительных кишечных палочек;
- определение бактерий группы кишечных палочек;
- определение количества микроорганизмов физиологических групп (протеолитов, аммонификаторов, нитрификаторов);
- количество и сроки выживания патогенных энтеробактерий *S.typhimurium* в воде;
- определение рН воды, растворенного кислорода, биохимического потребления кислорода, азота аммиака, азота нитритов, азота нитратов;
- показатели жизнеспособности обитателей водоемов (рачков *Dafnia magna* и рыб - гуппи).

Воздействие микроорганизмов-продуцентов на процессы самоочищения почвы, на почвенный биоценоз и сроки выживания в почве патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов изучалось с помощью следующих критериев:

- общая численность сапрофитных микроорганизмов;
- общее число и процент почвенных бактерий;
- количество почвенных грибов и актиномицетов;
- концентрация азота, аммония и нитратов;

- динамика разрушения клетчатки;
- сроки выживания в почве тест-микроорганизмов (*E.coli* и *S.typhimurium*);
- токсичность почвы к тест-микроорганизмам.

Естественно что при оценке воздействия промышленных микроорганизмов на биоценоз и процессы самоочищения водных объектов и почвы нет единых количественных критериев, характеризующих процессы самоочищения, жизнеспособность обитателей водоемов, микробиоценоз воды и почвы. Это зависит от целого ряда условий: климатических, типов почвы и водоемов, вида земле- и водопользования и других причин. Действие микроорганизмов-продуцентов следует учитывать по достоверному изменению вышеуказанных показателей во времени в эксперименте, относительно контрольных образцов, не содержащих микроорганизмов-продуцентов.

Экспериментальные исследования воздействия биотехнологических штаммов на микробиоценоз и процессы самоочищения воды водоемов выполнялись на модельных водоемах с нативной речной водой из р. Москвы. Модельные водоемы содержались при комнатной температуре на рассеянном свете. Концентрации микроорганизмов, вносимых в водоемы, соответствовали их количеству в местах выпуска сточных вод. *S.typhimurium*, как представителей патогенной микрофлоры, вносили в количествах 10^4 - 10^5 кл/мл, *E.coli* - 10^4 кл/мл. Микроорганизмы-продуценты вносили в концентрациях 10^4 , 10^6 и 10^8 кл/л, то есть в количествах возможного попадания в воду водоемов с промышленными, ливневыми водами или с сельскохозяйственных полей. В одной серии опытов штаммы-продуценты вносились однократно, в другой - 3 раза с интервалом в 5 суток. Определяли влияние промышленных микроорганизмов на водный микробиоценоз. Идентификация микроорганизмов-сапрофитов осуществлялась в соответствии с разработанным нами кодом-определителем [6].

В основу исследований по почве положена методика «почвенных закладок» [7]. Экспериментальную почву обсеменяли культурами тест-микроорганизмов из расчета: *E.coli* - 10^6 клеток на 1 г почвы, *S.typhimurium* - 10^4 кл/г, то есть в количествах, близких к естественному фекальному загрязнению почв. В почву опыта вносились микроорганизмы-продуценты в количествах 10^8 кл/г почвы. В одной серии опытов обсеменение почвы промышленными микроорганизмами проводилось однократно, в другой серии - 5 раз с интервалом в 10 суток. Для оптимизации процессов нитрификации использовали методику Н.И. Хлебникова [8]. Почву помещали в лабораторные сосуды и сетчатые капроновые мешки для проведения лабораторных и натуральных экспериментов. Капроновые мешки опускали в грунт опытного участка. Кроме того, в изучаемую почву опыта и контроля закладывали полоски ткани из чистого льна [9].

Результаты исследований показали, что загрязнение почвы биотехнологическими штаммами родов *Pseudomonas* и *Candida* вызывает разбалансировку почвенного микробиоценоза и подавляет самоочищающую способность почвы, что необходимо учитывать при разработке гигиенического нормирования данных микроорганизмов в окружающей среде. Напротив, микроорганизмы-продуценты рода *Bacillus* не подавляют процессов самоочищения почвы и не оказывают отрицательного действия на почвенный микробиоценоз. С этих позиций загрязнение почвы такими микроорганизмами может не учитываться при разработке гигиенических регламентов поступления этих штаммов в окружающую среду.

Данные исследований по загрязнению воды водоемов промышленными микроорганизмами на примере *Bac.thuringiensis* и *Brevi Bact.flavum* показали, что при попадании в воду изученные штаммы сохраняются в ней в течение длительного времени - полутора и более месяцев. Интенсивное и особенно многократное загрязнение воды клетками продуцентов приводит к изменению структуры сапрофитной микрофлоры. Процессы самоочищения воды, содержащей высокие концентрации промышленных микроорганизмов, протекали менее интенсивно. Содержание в экспериментальной воде кишечных палочек и бактерии этой группы было значительно выше, чем в контроле, а сроки выживания патогенных энтеробактерий *S.typhimurium* - более длительные. Установлено, что в условиях

массивного и многократного загрязнения штаммами-продуцентами воды процессы биохимического окисления органических веществ подавляются, а содержание растворенного кислорода в воде водоемов снижается.

Воздействие штаммов *Bac.thuringiensis* и *Brevi Bact.flavum* на жизнедеятельность и выживаемость рыб и ракообразных не выявлено.

Таким образом, по степени воздействия на объекты окружающей среды все штаммы-продуценты, предлагаемые к использованию в биотехнологии, можно разделить на 3 группы.

1-я группа - штаммы-продуценты, которые не могут быть использованы в биотехнологии и не подлежат гигиеническому нормированию. К этой группе следует относить штаммы-продуценты, способные к размножению в воде водоемов и почве.

2-я группа - штаммы-продуценты, которые могут быть использованы в биотехнологии и не подлежат гигиеническому нормированию (с позиций отсутствия воздействия на окружающую среду). К этой группе следует относить штаммы-продуценты, не размножающиеся в окружающей среде и не обладающие негативным воздействием на микробиоценоз и процессы самоочищения воды водоемов и почвы.

3-я группа - штаммы-продуценты, которые могут быть использованы в биотехнологии при условии гигиенического нормирования этих микроорганизмов в объектах окружающей среды. К этой группе следует относить штаммы-продуценты, не размножающиеся в воде водоемов и почве и воздействующие на микробиоценоз и процессы самоочищения воды водоемов и почвы в определенных концентрациях.

На основании результатов собственных исследований и данных литературы должны быть сделаны следующие выводы:

1. Регламентирование биотехнологических штаммов в объектах окружающей среды возможно лишь при комплексной гигиенической оценке воздействия этих микроорганизмов на окружающую среду и здоровье человека.

2. Обязательными этапами исследований при разработке гигиенических нормативов в водных объектах и почве являются:

первичная санитарно-гигиеническая оценка патогенных свойств производственных штаммов;

постановка хронического эксперимента на лабораторных животных;

изучение выживаемости микроорганизмов-продуцентов в воде и почве и оценка воздействия этих штаммов на процессы самоочищения и микробиоценоз воды водоемов и почвы.

Библиографический список

1. Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза: Методические рекомендации. М., 1992. 23 с.

2. *Ивашина С.А.* Биологическая и гигиеническая оценка энтомопатогенных микроорганизмов из группы *Bac.cereus*, применяющихся в производстве бактериальных препаратов: Автореф. дисс. канд. биол. наук. М., 1974. 24 с.

3. *Дабуров К.Н.* Гигиеническое обоснование регламентов применения бактериальных инсектицидов на основе *Bacillus thuringiensis* в сельском хозяйстве: Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 1980. 24 с.

4. *Омельянец Т.Г.* Гигиенические аспекты охраны окружающей среды в связи с применением в сельском хозяйстве микробных препаратов на основе неспорообразующих микроорганизмов: Автореф. дисс. докт. мед. наук. М., 1982. 38 с.

5. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды. М., 1991. 22 с.

6. *Пивоваров Ю.П., Меренюк Г.В., Лапенков М.И.* Определитель санитарно-значимых микроорганизмов. Кишинев: «Штиинца», 1982. 156 с.

7. *Соболева К.П., Волкова Д.А., Тарков М.И.* Размножение патогенных клостридий в почве. Кишинев: «Штиинца», 1977. 143 с.

8. *Хлебников Н.И.* Исследования по обеззараживанию промышленных сточных вод на сельскохозяйственных полях. М., 1965. С.5.

9. *Востров И.С., Петрова А.Н.* Определение биологической активности почвы различными методами // Микробиология. 1961. Т.30, вып.4. С. 665

2-й Московский медицинский институт

Поступила в редакцию 1.12.94
после переработки 13.12.95

Российский государственный медицинский университет

A MODERN CONSIDERATION OF THE PROBLEM OF HYGIENIC NORMS OF BIOTECHNOLOGICAL BACTERIA CULTURES IN ENVIRONMENT

Y.P. Pivovarov, V.V. Korolik

This work is the first to define the quantitative criteria and scheme of initial sanitary-hygienic evaluation of pathogenic characteristics of cultures of bacteria, proposed for biotechnological use. The reserved results prove the negative action of biotechnological cultures of bacteria on biocoenosis and processes of self-purifying of water in natural sources and soil. The division of industrial cultures of bacteria in groups according to the manifestation of their pathogenic characteristics and degree of action on environmental objects are given. The necessity of complex hygienic research work for finding out the normal concentration of industrial microorganisms is motivated. The main stages of research for hygienic norms of environmental concentration of biotechnical culture are described.



Пивоваров Юрий Петрович - родился в 1936 году в Луганске, окончил лечебный факультет 2-го Московского медицинского института (1962). Защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (1966) и диссертацию на соискание доктора медицинских наук (1971) во 2-м Московском медицинском институте. Профессор, чл.-корр. РАМН. Область научных интересов - экология, санитарная микробиология и гигиена питания. Автор нескольких монографий, в том числе: «Определитель санитарно-значимых микроорганизмов», «Справочник по санитарной микробиологии» и трех учебников. Опубликовал более 150 научных статей по направлениям, указанным выше. Зам.председателя секции «Новые медицинские технологии» Головного Совета «Экология и здоровье», председатель секции «Гигиенические аспекты биотехнологии и микробного загрязнения окружающей среды» Проблемной комиссии «Научные основы экологии человека и гигиены окружающей среды», зам. председателя секции по преподаванию вопросов экологии Всероссийского учебно-методического Совета МЗ РФ.



Королик Виктор Вячеславович - родился в Москве в 1952 году. Окончил лечебный факультет 2-го Московского медицинского института (1976) и работает на кафедре гигиены этого института. Защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук в Ленинградском санитарно-гигиеническом институте (1981). Доцент кафедры гигиены Российского государственного медицинского университета. Область научных интересов: экология, санитарная микробиология, гигиена питания. Опубликовал более 30 научных статей по указанным выше направлениям. Член секции «Гигиенические аспекты биотехнологии и микробного загрязнения окружающей среды» Проблемной комиссии «Научные основы экологии человека и гигиены окружающей среды».