

663

Г75

Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко, В. И. Панфилов

# **БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ**

## **биотехнологических производств**



**ДЕЛИ**  
ПРИНТ



663  
Г75

Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко,  
В. И. Панфилов

## **Биологическая безопасность биотехнологических производств**

Допущено Учебно-методическим объединением по образованию в области химической технологии и биотехнологии в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению и специальности «Биотехнология»

Москва  
Дели принт  
2010

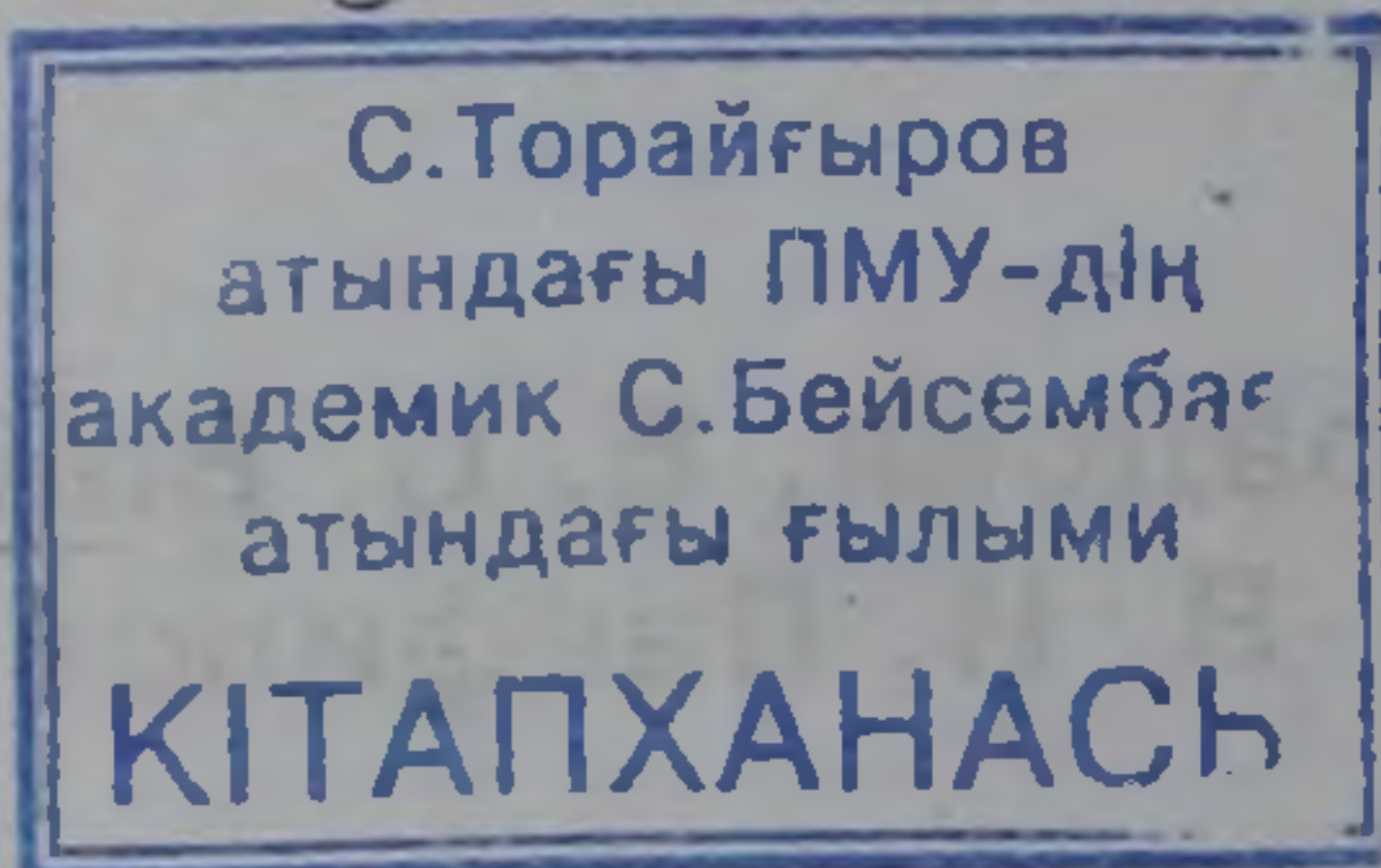


606491

УДК 663.12(075.8)

ББК 30.16(я73)

Г75



**Рецензенты:**

докт. техн. наук *В. В. Бирюков*;  
профессор кафедры экологии и промышленной безопасности  
руководитель отдела охраны труда и техники безопасности  
МГТУ им. Н. Э. Баумана, докт. техн. наук *Б. С. Ксенофонов*;  
доцент кафедры микробиологии медицинского факультета РУДН  
*Э. Г. Кравцов*

**Градова Н. Б., Бабусенко Е. С., Панфилов В. И.**

Г75 Биологическая безопасность биотехнологических производств  
[Текст] : учебное пособие / Н. Б. Градова, Е. С. Бабусенко,  
В. И. Панфилов. – М.: ДеЛи принт, 2010. – 136 с.

ISBN 978-5-94343-188-3

Данное учебное пособие предназначено для студентов технических и химико-технологических высших учебных заведений, обучающихся по специальности 07.01 «Биотехнология» и посвящено проблеме биологической безопасности биотехнологических производств. Пособие включает биологические, медицинские, технологические и инженерные вопросы – как основы для обеспечения биологической безопасности биотехнологических производств. Биотехнологические производства рассматриваются как источник эмиссии «биологического фактора», включающего живые, инактивированные клетки биообъектов, продукты их метаболизма и синтеза. Рассмотрены гигиенические характеристики биообъектов, даны понятия об инфекционном процессе, санитарно-гигиенической оценке биообъектов, методах определения патогенности штаммов, обоснования ПДК живых, инактивированных клеток и биотехнологических продуктов, содержащих их. Приведены принципиальные технологические схемы, инженерно-технологическое обеспечение безопасности биотехнологических производств, способы очистки газовоздушных выбросов и сточных вод. Данные сведения необходимы биотехнологам и экологам при разработке новых биотехнологических процессов при реализации существующих для обеспечения безопасности человека и охраны окружающей среды.

УДК 663.1

ББК 30.16(я73)

© Градова Н. Б., Бабусенко Е. С.,  
Панфилов В. И., 2010

ISBN 978-5-94343-188-3

© Оформление. ДеЛи принт, 2010



## 1. Биотехнология: этапы развития

Биотехнология – это междисциплинарная область знаний, возникшая на стыке биологических, химических и технических наук как результат научно-технического прогресса. Биотехнология (по определению Европейской биотехнологической федерации) – это наука, которая на основе применения знаний в области биологии, микробиологии, биохимии, генетики, иммунологии, химической технологии, приборо- и машиностроения использует биологические объекты или молекулы для промышленного производства полезных для человека веществ и продуктов.

К биологическим объектам, используемым в биотехнологии, в соответствии с директивами специальной комиссии ЕЭС (апрель 1988 г.), относятся «одноклеточные и субклеточные единицы (в том числе генетически измененные), культивируемые клетки тканей растений и животных, способные к самовоспроизведению». В биотехнологии преимущественно используются микроорганизмы (бактерии, грибы, простейшие, вирусы), клетки растений и животных, а также биологически активные вещества специального назначения (например, иммобилизованные ферменты, катализирующие синтез и распад полимеров).

Биотехнология образовала новое фундаментальное и прикладное направление в ряде областей биологических наук, медицинской науке, экологии и др.

Наука биотехнология эволюционировала по мере развития научно-технического потенциала человеческого общества. История развития биотехнологии уходит далеко в глубь веков. Выделяют несколько периодов в развитии биотехнологии.

Первый (допастеровский), *эмпирический* период развития биотехнологии охватывает примерно 8 тысячелетий, из которых более 6 тысячелетий – до нашей эры. В этот период человеком интуитивно



использовались микробиологические процессы для получения и сохранения продуктов питания и кормов (приготовление хлеба, пива, вина, уксуса, кисломолочных продуктов, квашение овощей, приготовление силоса и др.);

Научно-техническое развитие общества привело ко второму (пастеровскому и послепастеровскому), *этиологическому* периоду развития биотехнологии, который длился со второй половины XIX века, включая первую треть XX века. Этот период связан с выдающимися работами французского ученого Луи Пастера (1822–1895 гг.), который стал основоположником общей микробиологии и ряда микробиологических дисциплин (промышленной микробиологии, медицинской микробиологии, санитарной микробиологии и др.). Пастер опроверг существовавшую в те времена теорию о самозарождении жизни, установил микробную природу брожений, открыл возбудителей ряда инфекционных заболеваний, создал научные основы применения вакцин для профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

В этот период большой вклад в развитие как микробиологии, так и биотехнологии внесли и другие исследователи: И.И. Мечников (фагоцитарная теория иммунитета), Р. Кох (разработка метода культивирования микроорганизмов на плотных питательных средах и получение чистых культур), Д.И. Ивановский (открытие существования вирусов) и др.

Запросы практики, развитие биологических знаний определило развитие третьего этапа биотехнологии – *технологического*. В этот период были разработаны научные основы и технические приемы культивирования микроорганизмов; разработаны теоретические основы непрерывного культивирования микроорганизмов; созданы и внедрены в практику оборудование и аппараты для биотехнологических процессов; установлена каталитическая функция ферментов и кинетика ферментативных реакций; описан цикл трикарбоновых кислот; расшифрована структура ДНК.

В России развитие биотехнологической промышленности началось с создания спиртовых заводов. К 1913 г. в России насчитывалось более 3000 спиртовых заводов. В связи с развитием химической промышленности и повышенной потребностью в спирте, обусловленной ростом производства искусственного каучука, в России развивалась производство технического спирта из гидролизатов древесного сырья и целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства с одновременным получением кормовых дрожжей.



Советский период характеризуется дальнейшим развитием спиртовой промышленности. К 2000 г. производство этанола из непищевого сырья достигало уровня 80 млн. л в год.

Тридцатые годы XX столетия явились периодом разработки биотехнологий и освоения производства лимонной, молочной, масляной кислот, получения ацетона и бутанола, а также производства ферментных препаратов.

Важным этапом развития биотехнологии в мире и в России в 40-е годы прошлого столетия явилось начало производства антибиотиков как медицинского, так и кормового назначения.

Большой белковый дефицит обусловил развитие исследований и разработку биотехнологических процессов получения микробной биомассы и аминокислот из непищевых видов сырья.

Конец 70-х годов XX столетия характеризовался разработкой управляемых процессов биосинтеза, созданием крупнотоннажной индустрии получения антибиотиков, кормовых белковых продуктов, ферментов и аминокислот.

К 1975–80 гг. в России производилось до 1,2 млн. т в год микробной биомассы из непищевого сырья, в том числе около 800 тыс. т в год – из н-парафинов, 40 тыс. т в год – из нефтяных дистиллятов, 30 тыс. т в год – из природного газа и 3 т в год – из водорода. Характерной особенностью развития биотехнологии в России в этот период было создание крупнотоннажных производств белково-витаминных концентратов мощностью от 70 тыс. т в год до 180–300 тыс. т в год.

В России развивалась также промышленность по получению аминокислот. К 1990 г. производилось 40 тыс. т в год лизина (следует отметить, что к 2002 г. производство лизина в США составляло 220 тыс. т в год, а мировой уровень производства аминокислот составлял 0,5 млн. т в год); кормовых антибиотиков около 1,2 тыс. т в год; микробиологических средств защиты растений до 2,8 тыс. т в год. К 1985 г. полностью была подготовлена технология производства 150 ферментов.

В период политических и экономических преобразований в России в конце 80-х годов была приостановлена деятельность крупнотоннажных биотехнологических производств белково-витаминных концентратов, аминокислот, гидролизного спирта, микробиологических средств защиты растений и в значительной степени – производства ферментов.

В настоящее время вновь, но уже на ином уровне, ведутся работы по получению микробной биомассы, аминокислот и ферментов,



основанные на использовании в качестве сырья отходов сельского хозяйства, пищевой и других отраслей промышленности, а также по расширению ассортимента и повышению качества продуктов, снижение энергоемкости, обеспечению безотходности производства, автоматизации и компьютеризации технологий.

Для последних лет XX столетия характерно также развитие прикладных и фундаментальных исследований в области разработки процессов и препаратов, ориентированных на решение экологических проблем.

Четвертый (настоящий) период в развитии биотехнологии, *генотехнический*, определяется как период развития биотехнологии на новом уровне – на основе молекулярной биологии и молекулярной генетики.

В этот период была создана рекомбинантная молекула ДНК, показана возможность направленного изменения генетического материала бактерий; расшифрован генетический код; разработаны методы определения аминокислотной последовательности белков и анализа ДНК; осуществлен синтез гена инсулина и др. Бурно развиваются как фундаментальные генетические исследования, так и практические работы в области получения генноинженерных штаммов микроорганизмов и биотехнологических процессов на их основе. В 1980 г. началось производство человеческого инсулина, продуцируемого генно-модифицированным штаммом кишечной палочки, получены препараты интерферона, интерлейкина, соматотропина и др. на основе генноинженерных штаммов бактерий. Получены штаммы – супер-продуценты ряда продуктов, а также штаммы, обладающие свойствами, не характерными для природных штаммов (в частности, новые штаммы азотфиксаторов, компонентов симбиоза не с бобовыми растениями), светящиеся растения, клонированные растения и животные и др. Многие фундаментальные и прикладные разработки этого периода будут реализовываться в последующие годы.

Продукты, получаемые биотехнологическим путем, и биологические процессы широко применяются в различных отраслях народного хозяйства (табл. 1.1).

Как и другие промышленные предприятия и практическая деятельность человека, биотехнологические производства потенциально могут оказывать неблагоприятное воздействие на человека и окружающую среду. Характер такого воздействия определяется составом и количеством газовоздушных выбросов, сточных вод и твердых отходов производства.



**1.1. Области применения продуктов и процессов биотехнологии**

<b>Отрасли хозяйственной деятельности</b>	<b>Продукты</b>
Медицина и фармацевтика	Антибиотики (более 100 видов), микробные лекарственные препараты, ферменты желудочно-кишечного тракта (протеиназы и др.), витамины (В <sub>12</sub> , В <sub>2</sub> , β-каротин, рибофлавин), полисахариды (декстран, липополисахариды, хитин и др.), спирты (этанол), органические кислоты (лимонная, фумаровая, молочная, глюконовая и др.), пробиотики, вакцины, хитозан, процессы биотрансформации при получении стероидных гормонов, поли-β-оксибутират, биологически активные добавки
Растениеводство	Энтомопатогенные препараты, бактериальные удобрения, органические кислоты (пропионовая), антибиотики, гербициды и др.
Животноводство и ветеринария	Антибиотики (биовиты, бацитрацин и др., более 100 видов), витамины (В <sub>12</sub> , В <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> , β-каротин), органические кислоты (пропионовая), ферменты (протосубтилин), белково-витаминные концентраты, пробиотики, аминокислоты, вакцины, глобулины, биостимуляторы
Пищевая промышленность	Антибиотики (субтилин, низин), витамины (β-каротин), аминокислоты (лизин, глутаминовая кислота), ферменты (амилаза, инвертаза, лактаза и др.), органические кислоты (лимонная, фумаровая, глюконовая, молочная и др.), биомасса высших грибов, биологически активные добавки
Текстильная и кожевенная промышленность	Ферменты (липазы, протеазы и др.), органические кислоты (лимонная, фумаровая и др.)
Нефтяная и газодобывающая промышленность	Полисахариды (ксантан и др.), поверхностно-активные вещества
Металлургическая промышленность	Полисахариды, липиды (фосфолипиды, триацилглицериды)
Экология	Биопрепараты для биоремедиации загрязненных почв, поверхностных вод и техногенных потоков, для биокомпостирования органических отходов, очистки сточных вод и газовоздушных выбросов
Химическая промышленность	Биотрасформация отдельных этапов в химических процессах (например, при получении аскорбиновой кислоты, кортикостероидов и др.) акриламида из акрилонитрила



Особенность биотехнологии, использование процессов, связанных с биологическими объектами, определяет специфику техногенных факторов биотехнологических производств, которые могут быть источниками эмиссии «биологического фактора», биоаэрозолей и сточных вод, содержащих живые и инактивированные клетки, организмы, а также продукты их синтеза и метаболизма. Исключение возможного неблагоприятного воздействия «биологического фактора» на здоровье человека и качество окружающей среды решается как на стадиях разработки технологии, проектирования предприятий, так и на стадиях их эксплуатации.

В настоящее время выделяются два аспекта понятия безопасности биотехнологии: это *biosafesity* и *biosecurity*. Первое – *biosafesity* – определяет обеспечение безопасности биотехнологии для здоровья человека, персонала, защиту от патогенов и других вредных воздействий «биологического фактора».

Второй аспект – *biosecurity* – в наши дни приобретает важное как политическое, так и этическое значение – защита от злонамеренного использования «биологического фактора». Эти вопросы рассматриваются на международном уровне. Разрабатывается ряд документов под эгидой ООН, направленных на обеспечение использования достижений биотехнологии для общего блага, а не в террористических или иных преступных целях. Остро ставятся вопросы контроля над биотехнологиями в глобальной контртеррористической стратегии ООН. Эти проблемы требуют специального обсуждения и не рассматриваются в данном материале.

Задачей настоящего учебного пособия является рассмотрение проблем *biosafesity* биотехнологии, обеспечение безопасности для здоровья человека и окружающей среды.

### **Контрольные вопросы**

1. Биотехнология как наука и область практической деятельности.
2. Основные этапы развития биотехнологии.
3. Продукты биотехнологии, используемые в сельском хозяйстве.
4. Продукты биотехнологии, используемые в медицине.
5. Продукты биотехнологии, используемые для решения проблем охраны окружающей среды.
6. Понятие «безопасность биотехнологии».



## 2. Объекты биотехнологии

Объектами биотехнологии являются организмы разных групп: эукариоты, прокариоты, археи, вирусы, а также ассоциативные культуры и биоценозы. В биотехнологических производствах используются: бактерии, грибы, одноклеточные водоросли, простейшие, вирусы, клетки (ткани) растений и животных, а также эндо- и экзопродукты жизнедеятельности организмов (белки, ферменты, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, липиды, простагландины и др.).

В настоящее время наиболее широкое применение находят бактерии, актиномицеты, грибы и дрожжи (табл. 2.1).

В биотехнологических процессах используются представители разнообразных систематических и физиологических групп бактерий: грамотрицательные, грамположительные, автотрофные, хемотрофные, аэробные, анаэробные.

Метаболизм бактерий, по сравнению с эукариотами, характеризуется большим разнообразием. В качестве донора электронов в катаболических процессах бактерии используют как органические, так и неорганические соединения.

Гетеротрофные бактерии усваивают углерод различных органических соединений: метана, простых спиртов, органических кислот, углеводов, углеводородов, полисахаридов, ароматических и полиароматических соединений. Они способны активно развиваться как в присутствии кислорода атмосферы (аэробные), так и в его отсутствии (анаэробные); в широком диапазоне температур, pH среды и осмотического давления.

Бактерии способны синтезировать разнообразные эндо- и экзогенные продукты, имеющие практическое значение. К эндогенным продуктам можно отнести белки, нуклеиновые кислоты, витамины, ферменты и коферменты, липиды, токсины и др. К экзогенным продуктам – антибиотики, гидролитические ферменты, органические кислоты, токсины, витамины и др.



## 2.1. Биологические объекты, используемые в биотехнологии

Продукты и процессы биотехнологии	Бактерии	Актиномицеты	Грибы	Дрожжи
1	2	3	4	5
Антибиотики	<i>Bacillus brevis</i> (грамицидин); <i>B. polymyxa</i> (полимиксин); <i>B. subtilis</i> (субтилилин); <i>B. licheniformis</i> (бацитрацин)	<i>Streptomyces griseus</i> (стрептомицин); <i>S. aureofaciens</i> (тетрациклин); <i>S. erythreus</i> (макролиды); р. <i>Streptomyces</i> (нистатин)	<i>Penicillium chrysogenum</i> (пенициллин); <i>P. griseofulvum</i> (гризеофульвин) <i>Cephalosporium acremonium</i> (цефалоспорин)	
Витамины	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> (В <sub>12</sub> ); <i>Methanosarcina barkeri</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> (L-аскорбиновая кислота)	<i>Chrysomollus</i> var. <i>carotinoides</i> (каротиноиды)	<i>Eremothecium ashbyi</i> (В <sub>2</sub> ); <i>Aspergillus niger</i> <i>Blakeslea trispora</i> (каротиноиды)	<i>Pichia guilliermondii</i> (В <sub>2</sub> ); <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (D <sub>2</sub> ); <i>S. carlsbergensis</i> <i>Rhodotorula gracilis</i> (каротиноиды)
Кормовые белково-витаминные концентраты	<i>Methylococcus capsulatus</i> (на природном газе) <i>Ralstonia lutropha</i> (на водороде)			<i>Candida maltosa</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. utilis</i> (на углеводном и углеводородном сырье) <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. carlsbergensis</i> (на отходах зернопроизводства) <i>Kluveromyces marxianum</i> (на молочной сыворотке)



Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5
Биологически активные добавки и пробиотики	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (пробиотики)			p. <i>Candida</i> , p. <i>Yarrowia</i> (белково-углеводные добавки, обогащенные микроэлементами)
Липиды			p. <i>Lypomices</i>	<i>Cryptococcus terricolus</i> , <i>Rhodotorula rubra</i>
Ферменты	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> ( $\alpha$ -амилазы, протеиназы); <i>E. coli</i> (аспартаза, фумараза, пенициллинамидаза)		<i>Asp. niger</i> , <i>Asp. orysae</i> , <i>Asp. awamorii</i> ( $\alpha$ -амилазы, $\beta$ -глюконаза, целлюлазы, протеиназы, липазы, каталаза); <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> (целлюлаза); <i>Basidiomycetes</i> (лакказа)	<i>Candida cylindrical</i> (липаза); <i>Candida maltosa</i> (убихинон)
Органические кислоты	<i>Propionibacterium shermanii</i> (пропионовая); <i>Acetobacter aceti</i> (уксусная); <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (молочная); <i>Clostridium butyricum</i> (масляная); <i>Pseudomonas fluorescens</i> ( $\alpha$ -кетоглутар.); <i>Acetobacter</i> (глюконовая)		<i>Asp. niger</i> (лимонная); <i>Penicillium griseofulvum</i> (фумаровая)	



Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5
Спирты	<i>Zymomonas mobilis</i> (этанол); <i>Clostridium aceto-</i> <i>butyricum</i> (бутанол)			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (этанол)
Полисахариды и другие биополимеры	<i>Xantomonas campestris</i> (ксантан); <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> (β-полиоксибут)		<i>Leuconostos mesenteroides</i>	
Энтомопатогенные препараты	<i>B. thuringiensis</i> (энтобактерин, дендробациллин)		<i>Beauveria bassiana</i> (боверин)	
Бактериальные удобрения и препараты для рекультивации почв	<i>Azotobacter chroococcum</i> (азотобактерин); р. <i>Rhizobium</i> (нитрагин); <i>Bacillus megaterium</i> (фосфобактерин)			
Биологически активные соединения			<i>Fusarium moniliforme</i> (гиббереллины); р. <i>Claviceps</i> (алкалоиды)	
Лекарственные и медицинские препараты	<i>Pseudomonas putida</i> (рекомбинантный штамм) – интерферон; <i>Arthrobacter globiformis</i> (биотрансформация стероидных гормонов); <i>Salmonella typhi</i> (брюшнотифозная вакцина); <i>E. coli</i> (колибактерин)			



Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5
Препараты экологического назначения	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ps. putida</i> (компоненты препарата для биоремедиации сред, загрязненных нефтепродуктами); <i>Acetobacter oleovorans</i> (биоремедиация); активный ил разных родов (очистка сточных вод, газовоздушных выбросов)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (компонент препарата для биоремедиации сред, загрязненных нефтепродуктами)		p. <i>Candida</i> (компонент препарата для биоремедиации сред, загрязненных нефтепродуктами)

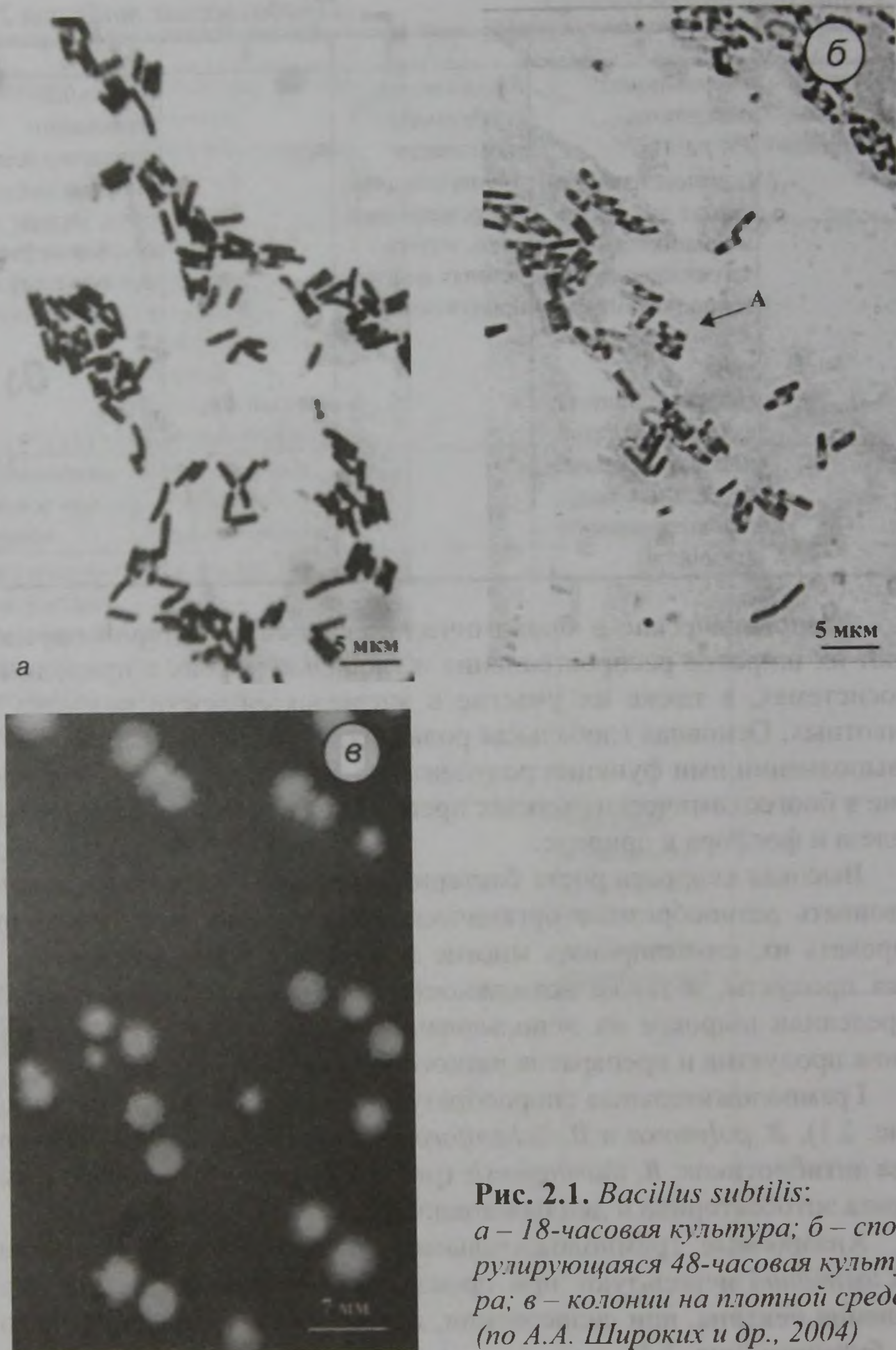
Физиологические и биохимические свойства бактерий определяют их широкое распространение и глобальную роль в природных экосистемах, а также их участие в жизнедеятельности человека и животных. Основная глобальная роль микроорганизмов заключается в выполнении ими функции редуцентов в трофической цепи, их участие в биогеохимических циклах превращения углерода, азота, серы, железа и фосфора в природе.

Высокая скорость роста бактерий и синтеза белка, способность усваивать разнообразные органические соединения или трансформировать их, синтезировать многие экзогенные полезные для человека продукты, а также возможность изменения генома бактерий, определили широкое их использование в биотехнологии для получения продуктов и препаратов разного назначения.

Грамположительные спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis* (рис. 2.1), *B. polymyxa* и *B. licheniformis* используются для производства антибиотиков; *B. thuringiensis* (рис. 2.2) – для получения биопрепарата энтобактерина и дендробацилина.

Анаэробные грамположительные спорообразующие бактерии р. *Clostridium* используют при производстве льноволокна, для разрушения пектина, при силосовании, для получения масляной кислоты, бутанола (рис. 2.3).





**Рис. 2.1.** *Bacillus subtilis*:  
 а – 18-часовая культура; б – спорулирующая 48-часовая культура; в – колонии на плотной среде  
 (по А.А. Широких и др., 2004)



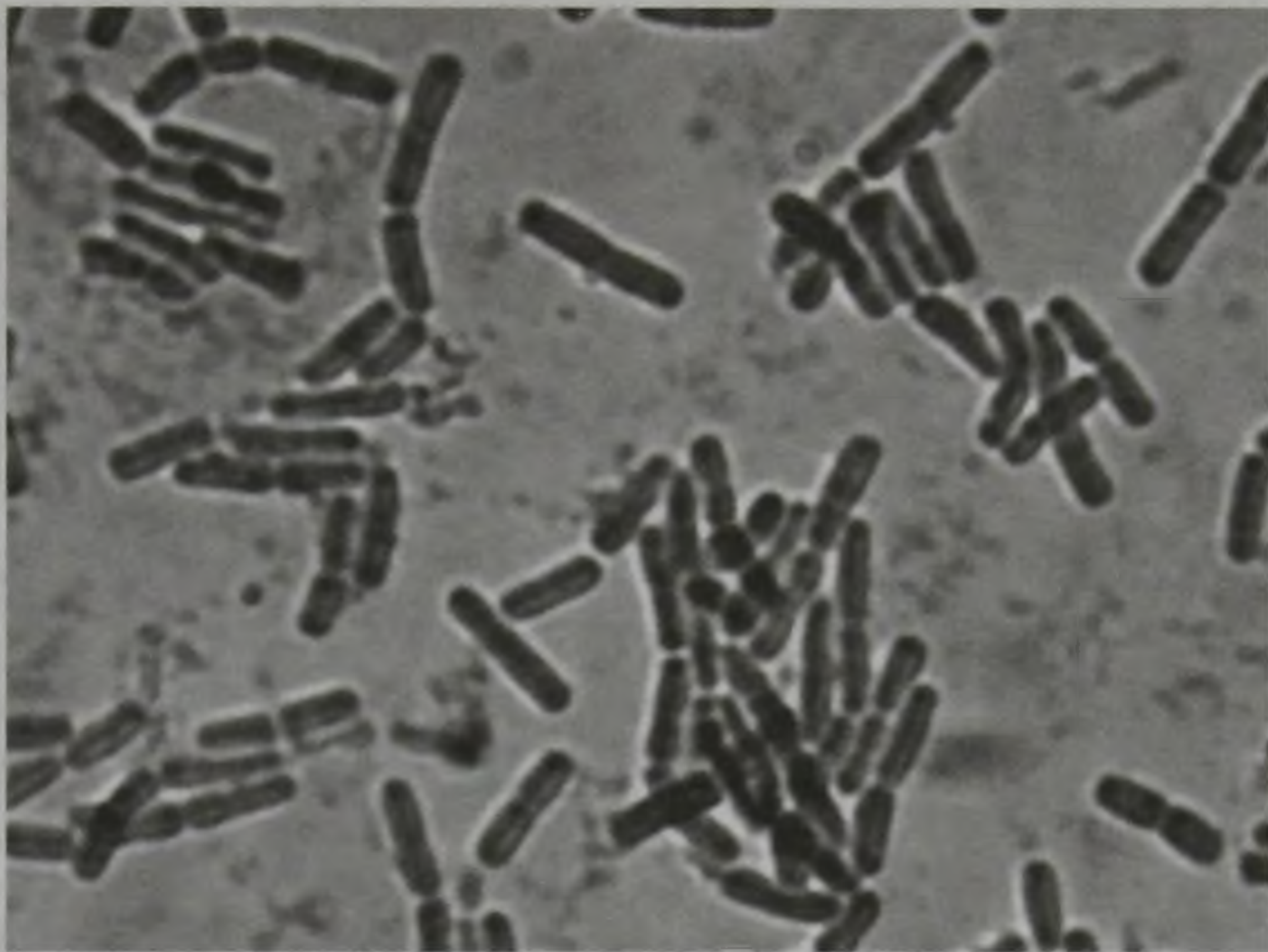


Рис. 2.2. *Bacillus thuringiensis*



Рис. 2.3. Терминальное расположение споры в клетках *Clostridium* (электронная микроскопия)

Грамположительные не образующие спор бактерии р. *Corynebacterium*, р. *Brevibacterium*, характеризуются неправильной формой клетки, используются для получения аминокислот, соответственно, глутаминовой и лизина, а бактерии р. *Arthrobacter* (рис. 2.4 а, б) используются в процессах трансформации стероидных гормонов.



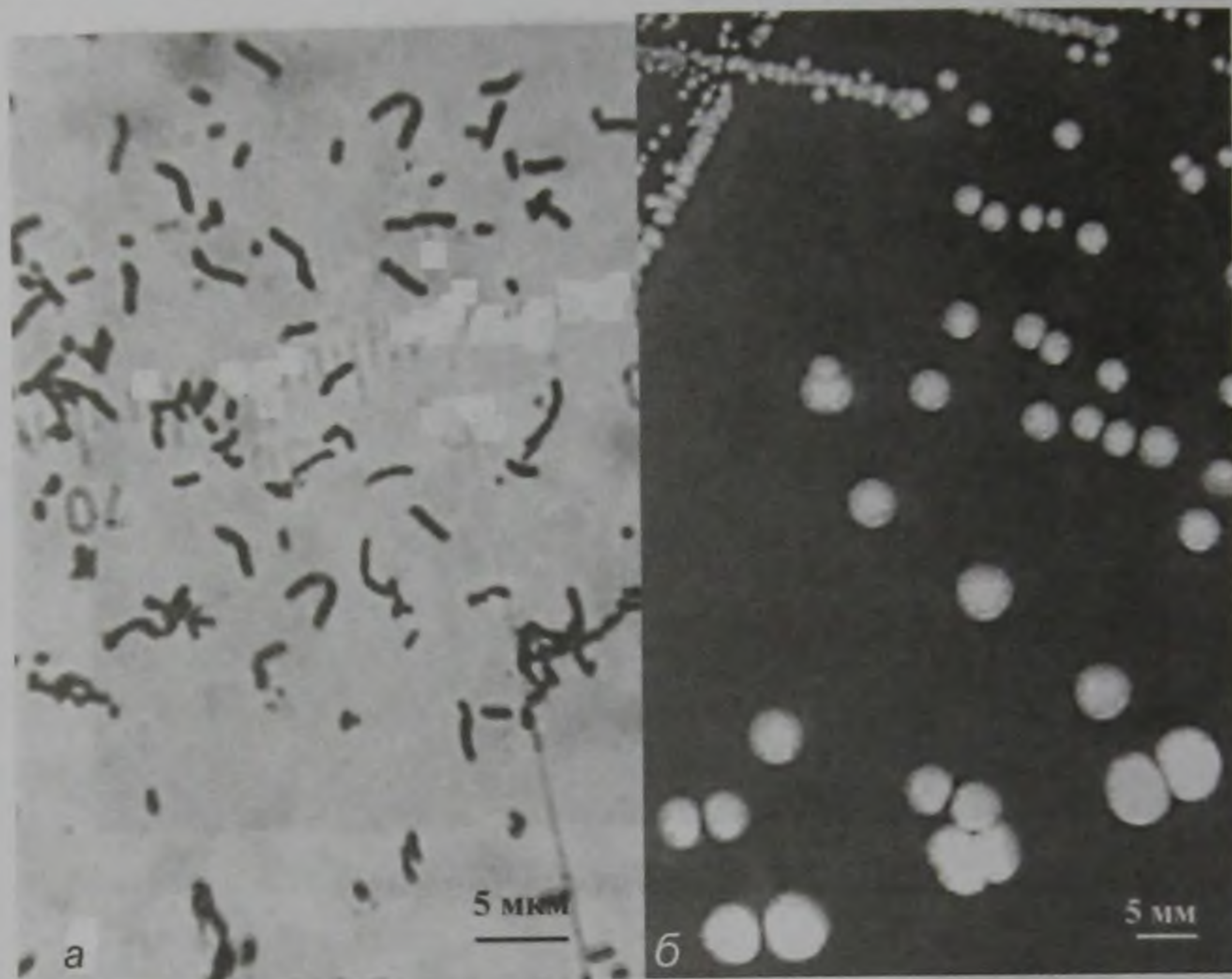


Рис. 2.4. *Arthobacter simplex*:

*а* – V-формы, образующиеся в результате деления; *б* – колонии на плотной среде (по А.А. Широких и др., 2004)

Широкое применение в производстве антибиотиков находят актиномицеты – группа грамположительных бактерий, характеризующаяся особенностями строения клеток.

Актиномицеты имеют форму тонкой длинной ветвящейся нити, напоминающей гифы грибов, диаметром 0,2–1,0 мкм. Нити актиномицетов, переплетаясь, как и гифы грибов, образуют видимый глазом мицелий (рис. 2.5). Некоторые актиномицеты (р. *Streptomyces*) размножаются спорами, поэтому они занимают как бы промежуточное положение между бактериями и грибами. Актиномицеты *Rhodococcus erythropolis* (рис. 2.6) входят в состав биопрепаратов, применяемых для биоремедиации нефтезагрязненных почв. Актиномицеты широко распространены в природе, активно участвуют в круговороте углерода. Среди актиномицетов имеются формы, вызывающие заболевания у человека и животных.



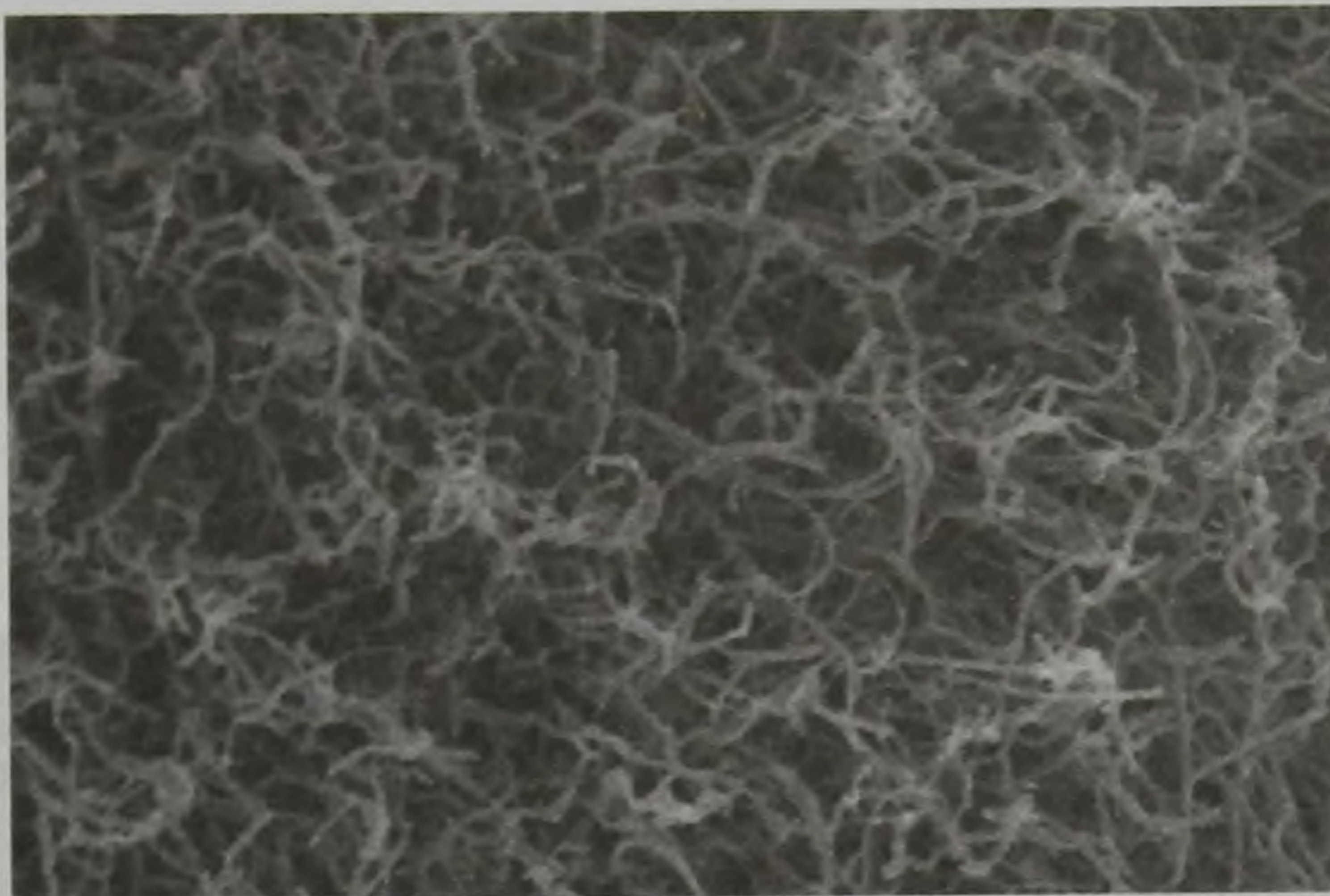


Рис. 2.5. Воздушный мицелий *Streptomyces* (электронная микроскопия)



606491  
С.Торайғыров  
атындағы ПМУ-дің  
академик С.Бейсембаев  
атындағы ғылыми  
КІТАПХАНАСЫ

Рис. 2.6. *Rhodococcus erythropolis* (электронная микроскопия)

Грамотрицательные аэробные метилотрофные бактерии *Methylococcus capsulatus* (рис. 2.7), растущие на природном газе, используются в промышленности для получения биомассы, применяемой для кормовых целей. Эта биомасса может также использоваться в качестве сырья для получения биополимеров, в частности, поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты.



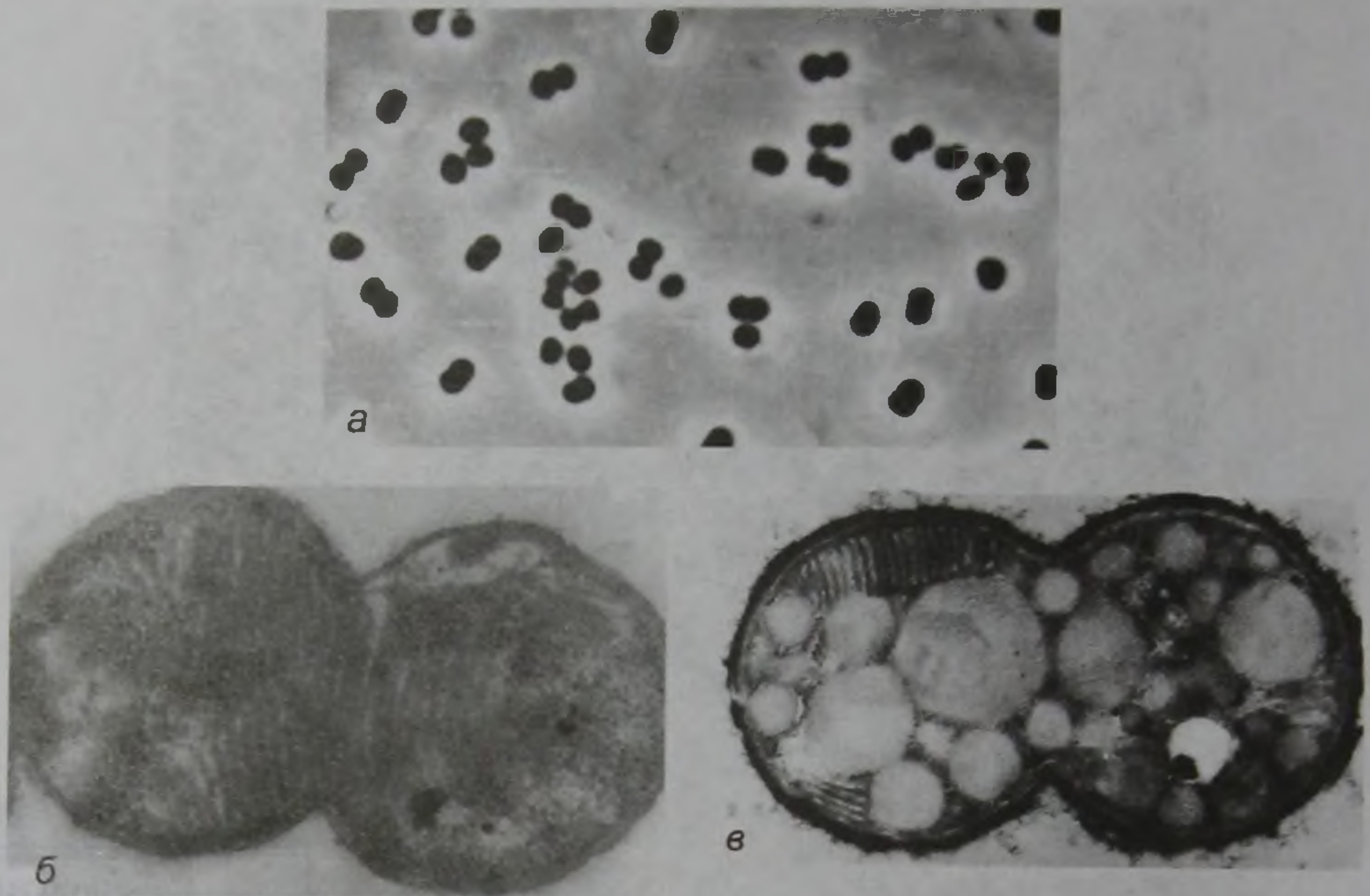
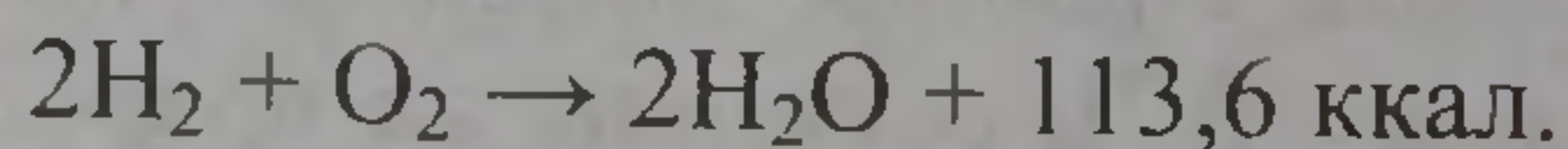


Рис. 2.7. *Methylococcus capsulatus*:

а – вегетативные клетки; б – внутрицитоплазматические мембраны (электронная микроскопия); в – накопление в клетке поли-β-оксимасляной кислоты (электронная микроскопия)

Для получения биомассы из водорода используются автотрофные грамотрицательные бактерии *Ralstonia eutropha* – аэробные или микроаэрофильные палочки и кокки, подвижные с латеральным или биполярным расположением жгутиков. Они относятся, по терминологии Г.А. Заварзина, к группе рассеяния и используют продукты метаболизма микроорганизмов, обитающих в анаэробной зоне. В клетках бактерий функционируют системы окисления энергетического субстрата ( $H_2$ ) и автотрофной ассимиляции  $CO_2$ . Энергию бактерии получают посредством окислительного фосфорилирования, сопряженного с цепью переноса электронов от НАДН к  $O_2$ . Донором электрона для восстановления НАД служит молекулярный кислород:



Активацию водорода и передачу электрона осуществляет специфический ферментный комплекс гидрогеназа:



Концентрация белка в клетках достигает 60–70%. Бактерии характеризуются накоплением безазотистого запасного вещества –



поли- $\beta$ -оксимасляной кислоты, содержание которой к стационарной фазе роста возрастает от 10% до 75% за счет резкого снижения количества белка до 25%. Культивирование возможно только в условиях интенсивной аэрации. Основным лимитирующим фактором роста является транспорт газовых компонентов в жидкую фазу. Реализован процесс без соблюдения стерильности, при стабилизации параметров культивирования на уровне, оптимальном для автотрофной быстрорастущей культуры.

Молочнокислые бактерии (рис. 2.8 и 2.9) являются основой для получения кисломолочных продуктов.

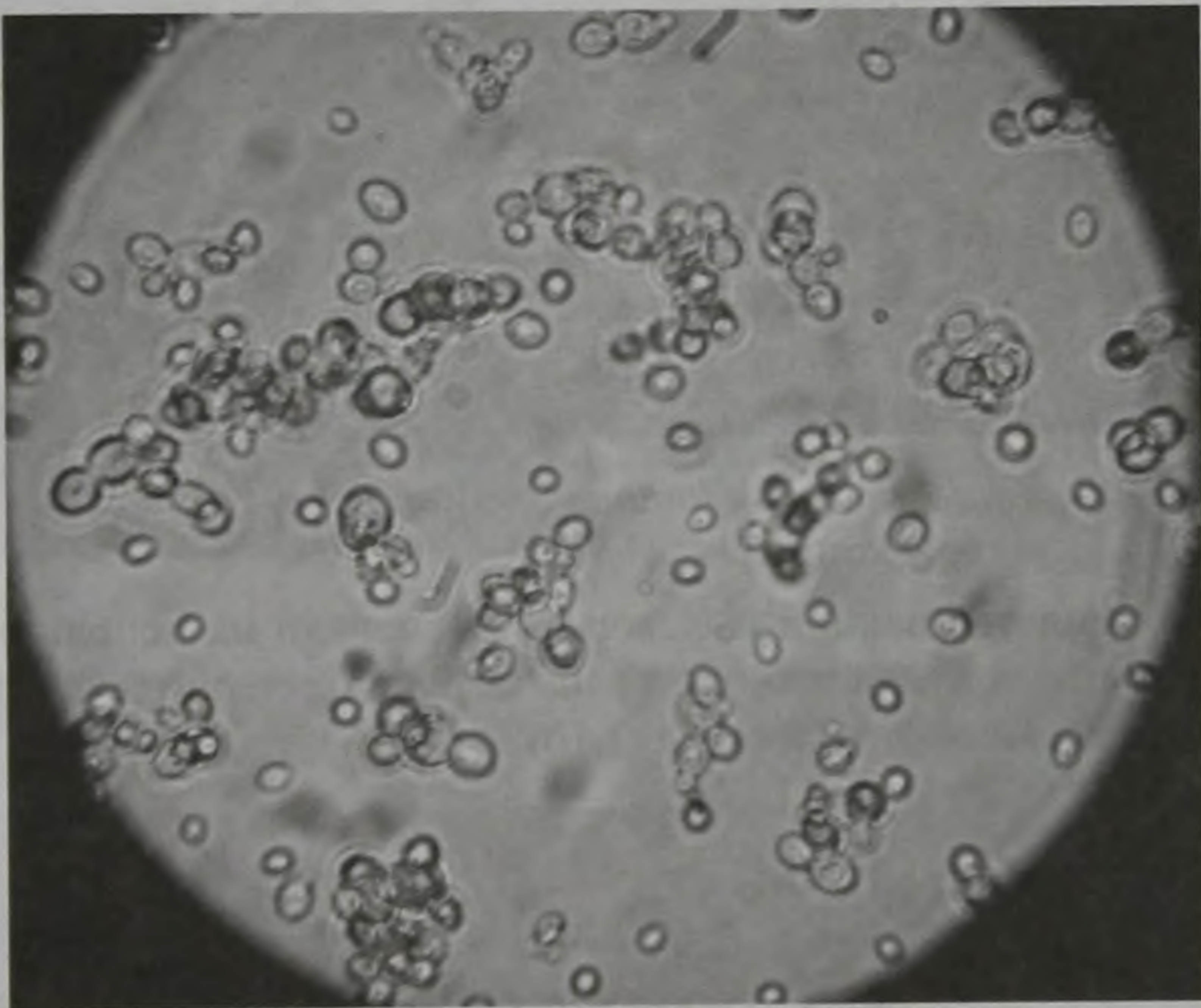
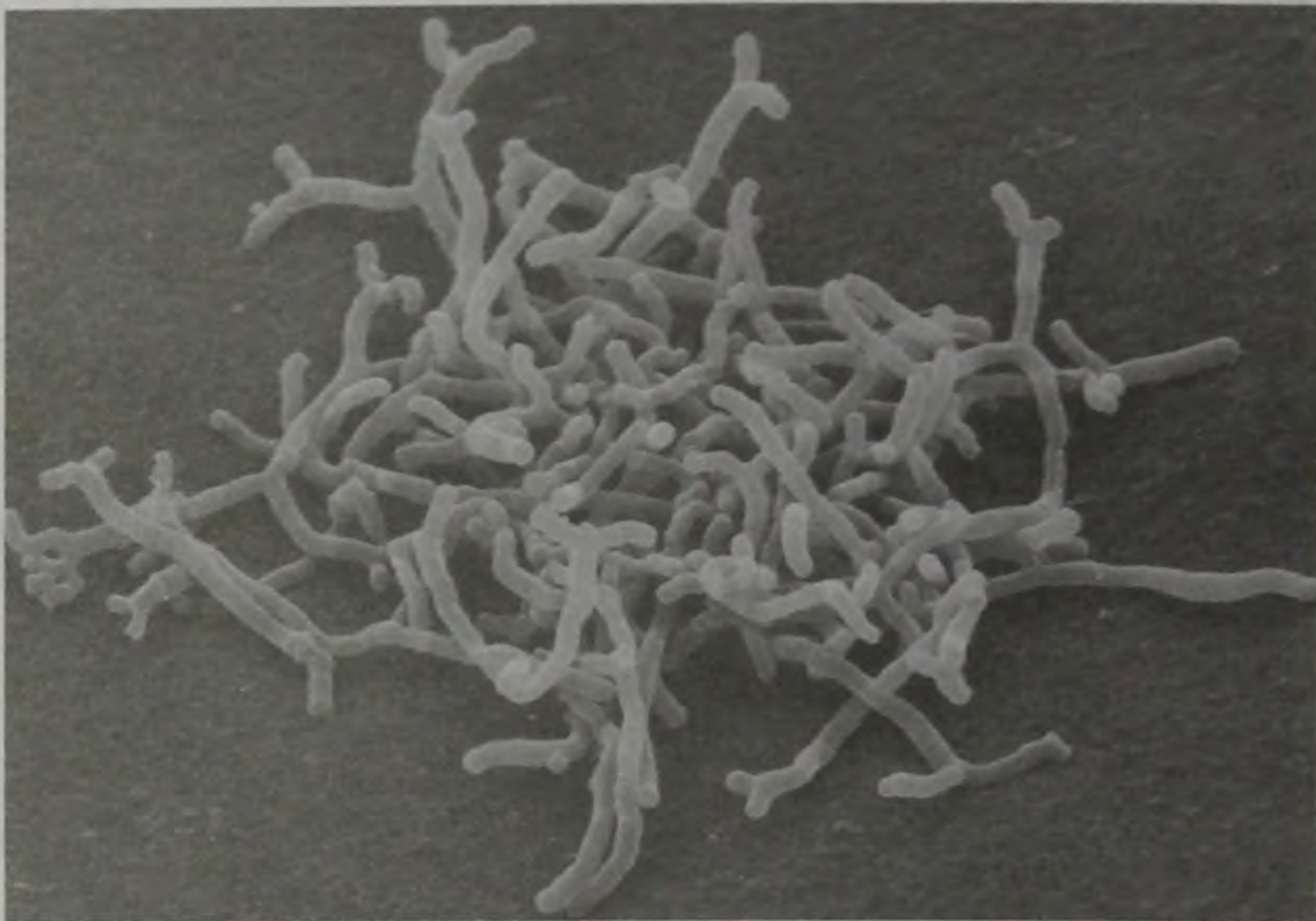


Рис. 2.8. Культура молочнокислых бактерий кефирного грибка

В производстве сыров и витамина  $B_{12}$  используются пропионовокислые бактерии. *Propionibacterium freudenreichii* – грамположительные, неспорообразующие, неподвижные, факультативно-анаэробные, азотолерантные или микроаэрофильные палочки. Склонны к плеоморфизму. Клетки неровные, с округлыми концами, могут иметь вид изогнутых палочек, кокков. Встречается рудиментарное ветвление, при низких значениях pH наблюдается вздутие и образование отростков. Хемоорганотрофы со сложными потребностями в питательных веществах. Обладают метаболизмом бродильного типа с образованием пропионовой кислоты. Используются в



пищевой промышленности в производстве заквасок для сыроделия, силосования, при производстве витамина В<sub>12</sub>.



**Рис. 2.9.** *Bifidobacterium longum* (сканирующая электронная микроскопия)

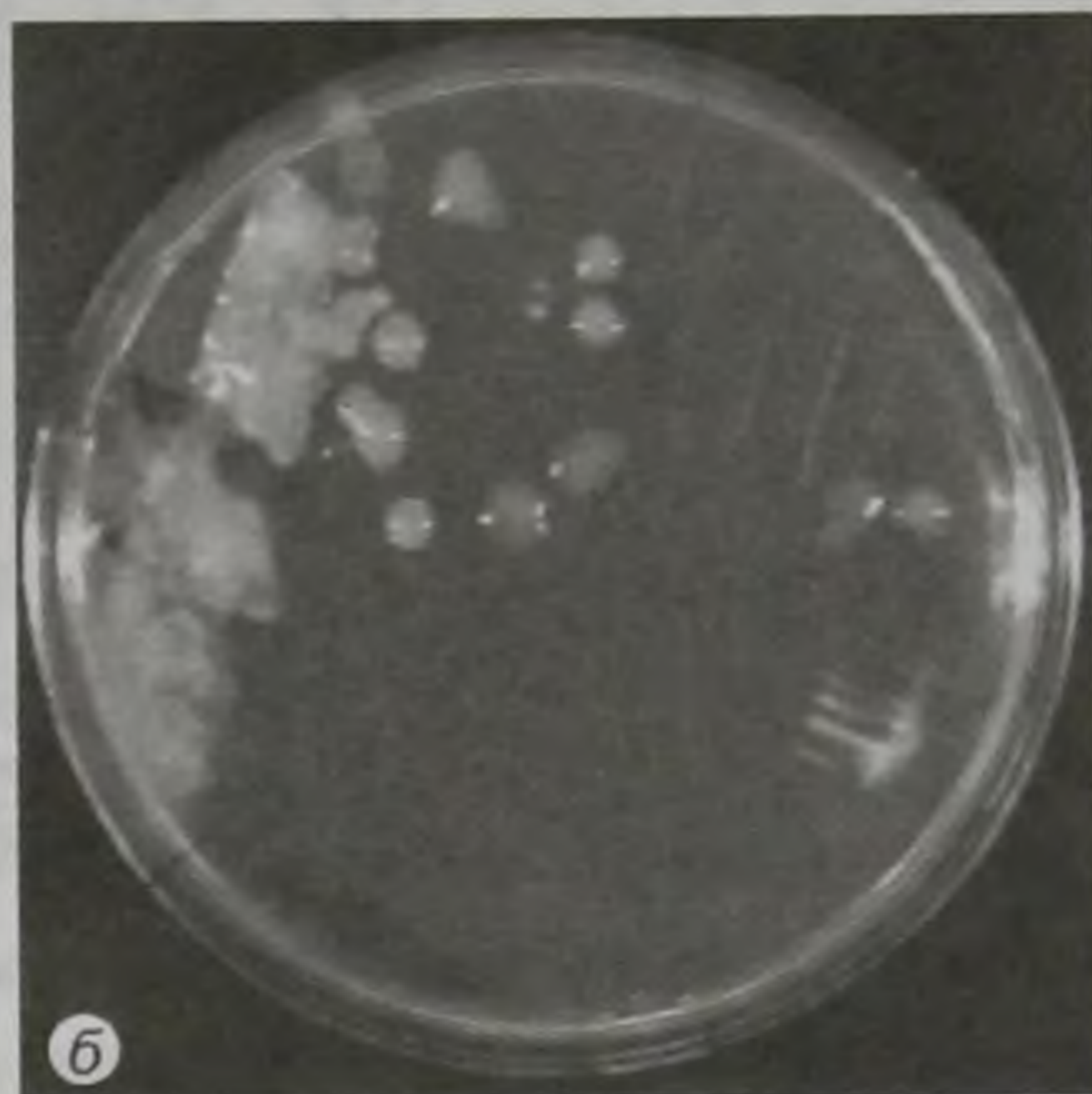
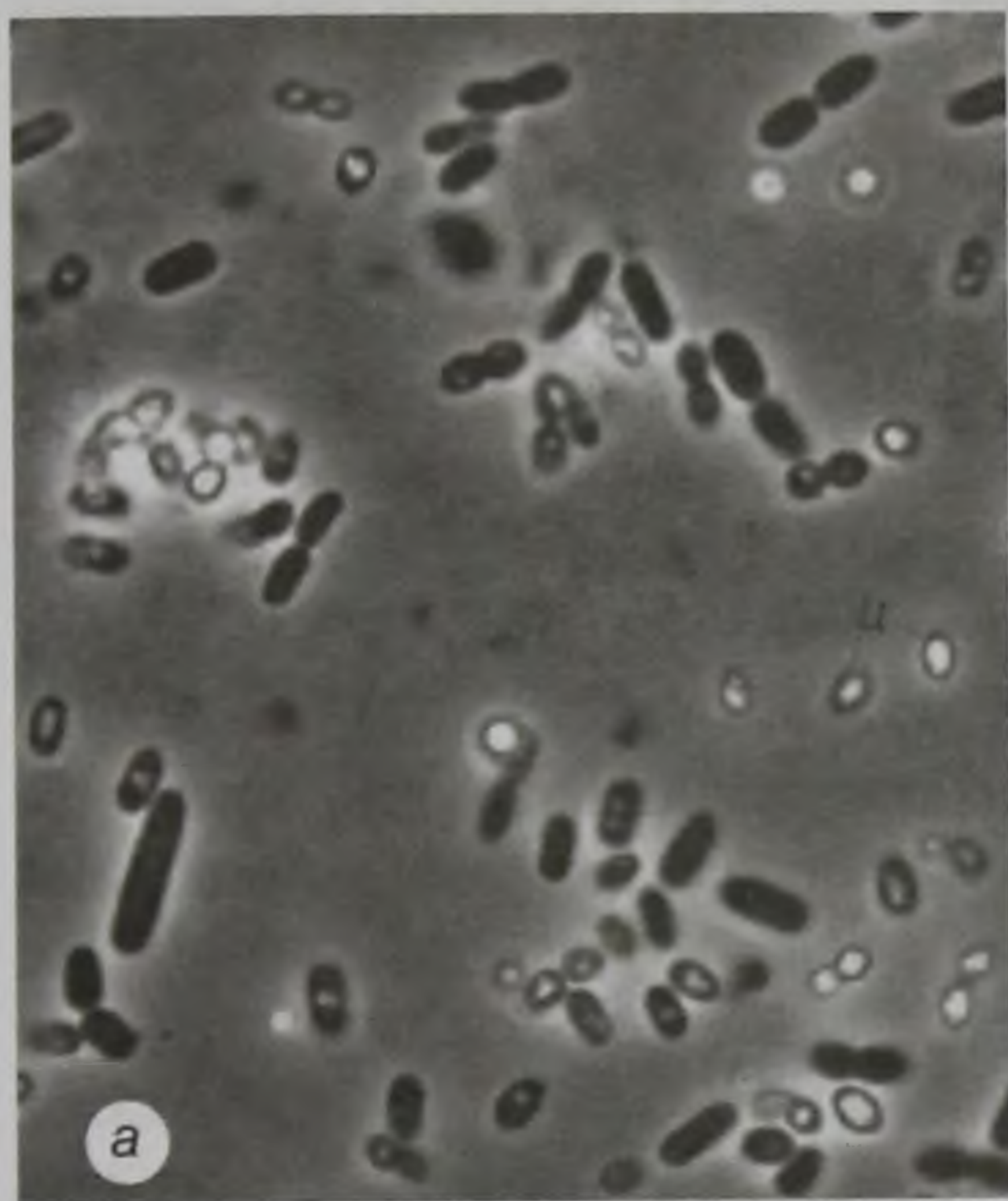
Производство вакцин и сывороток основано на использовании ряда патогенных и условно-патогенных групп бактерий, в частности, бактерий кишечной группы (рис. 2.10).



**Рис. 2.10.** *Escherichia coli* (электронная микроскопия)

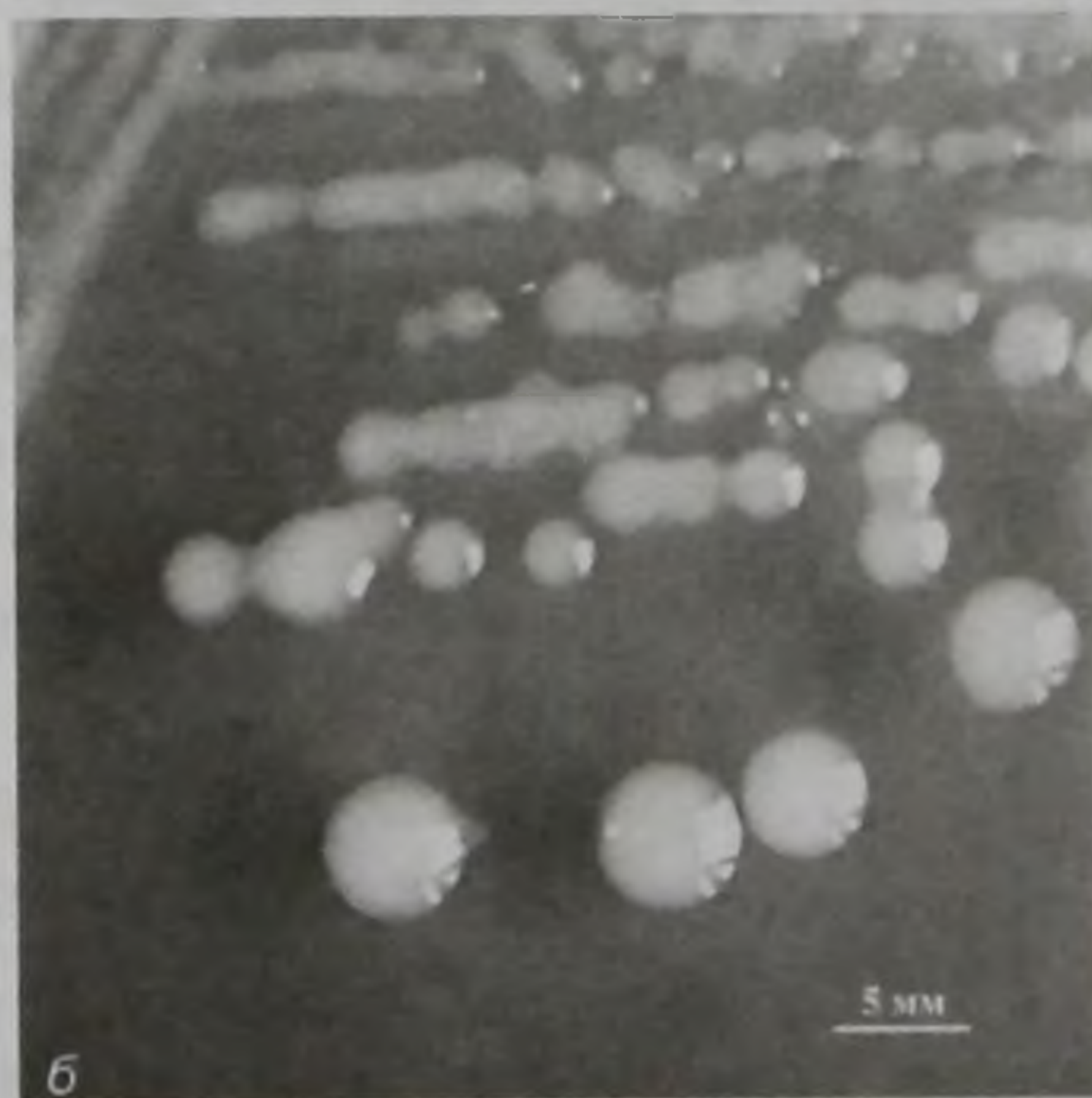
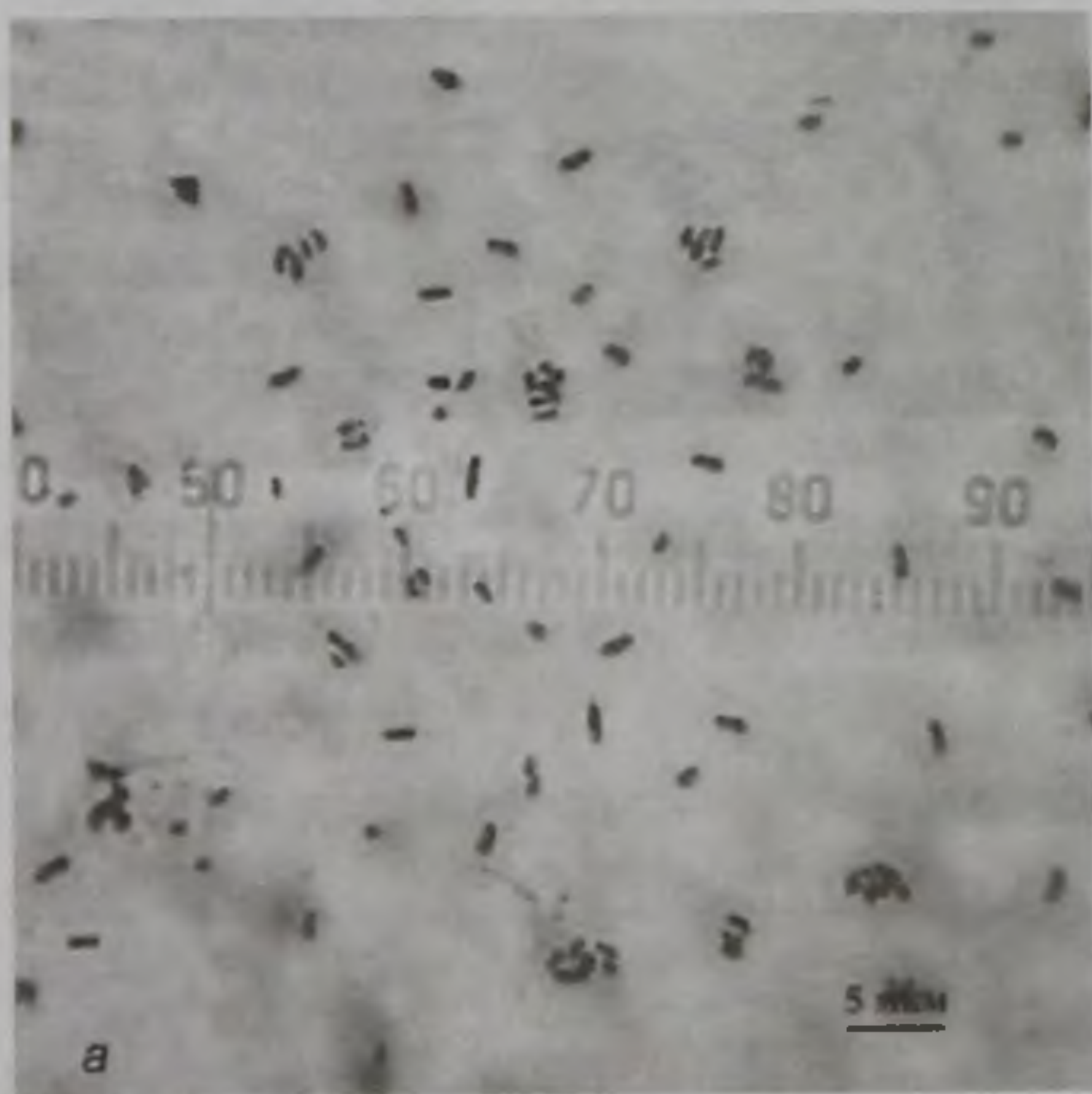


Грамотрицательные бактерии *Azotobacter* (рис. 2.11), *Acinetobacter*, *Rhizobium* (рис. 2.12), *Pseudomonas* (рис. 2.13) используются для получения бактериальных удобрений и препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв.



**Рис. 2.11.** *Azotobacter chroococcum*:

*а* – вегетативные клетки и цисты (Ц); *б* – колонии на плотной среде



**Рис. 2.12.** *Rhizobium leguminosarum*:

*а* – двухсуточная культура; *б* – колонии на плотной среде (по А.А. Широких и др., 2004)

В последние годы в биотехнологии начали активно использоваться и цианобактерии.



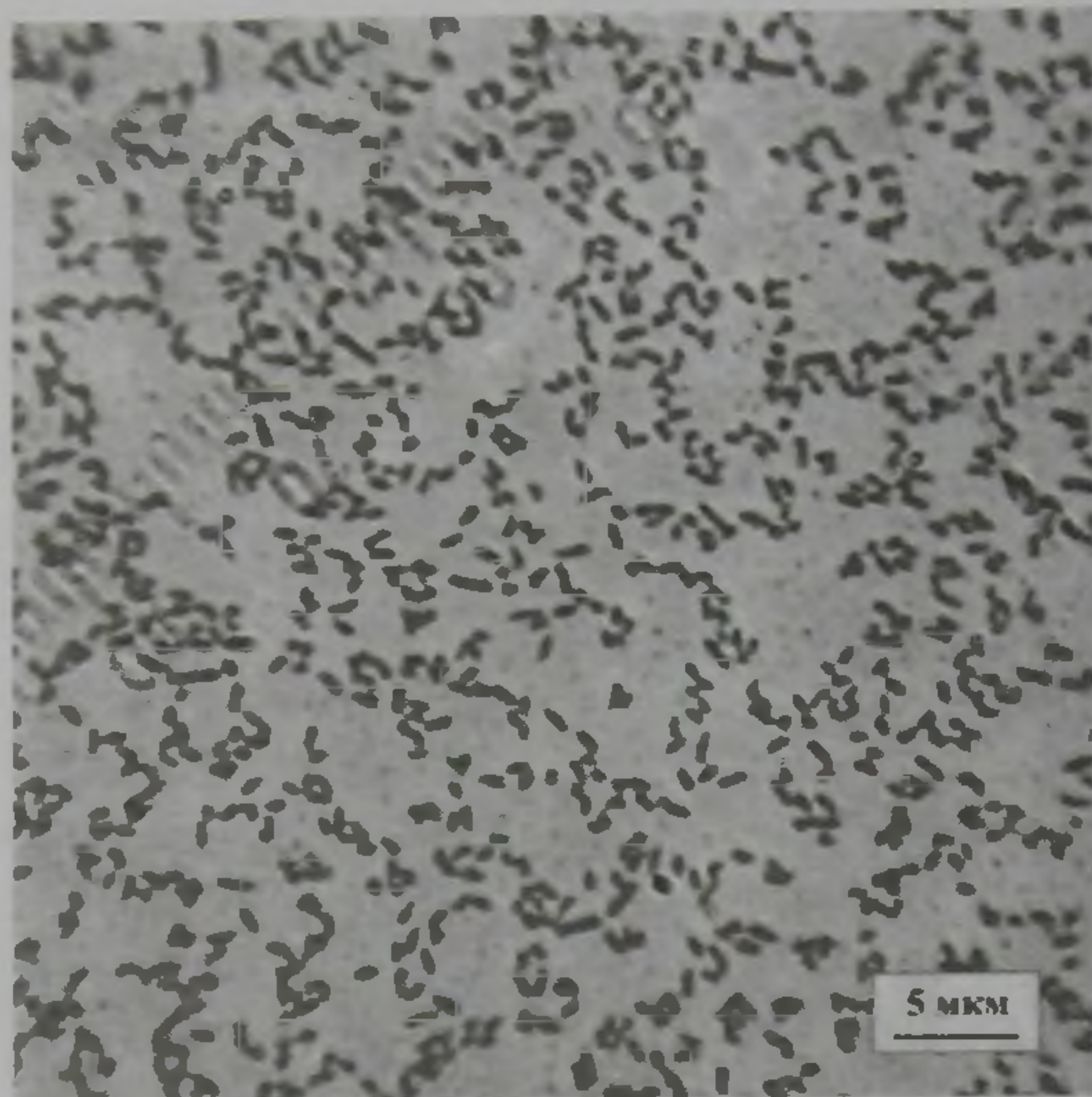


Рис. 2.13. *Pseudomonas putida*, суточная культура (по А.А. Широких и др., 2004)

Цианобактерии – это фотосинтезирующие бактерии, осуществляющие кислородный (с выделением кислорода) фотосинтез. Это одноклеточные или нитчатые формы (рис. 2.14).

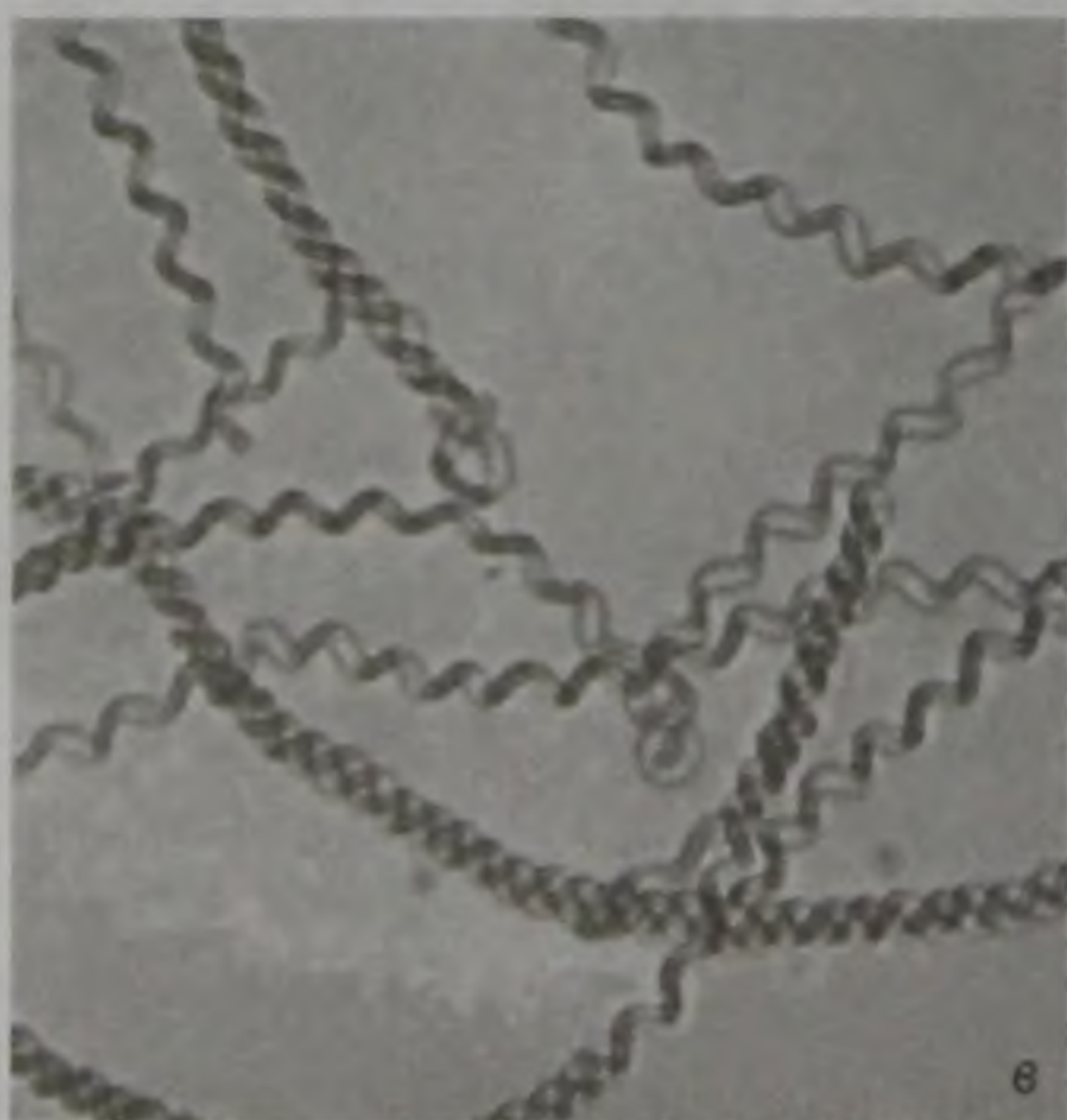


Рис. 2.14. Цианобактерии:  
а – *Anabaena*, Г – гетероциста;  
б – *Oscillatoria*; в – *Spirulina*



Цианобактерии способны фиксировать молекулярный азот атмосферы и развиваться в экстремальных условиях. Они распространены в озерах и других водоемах, в почве, на рисовых полях, на скальных породах. Цианобактерии принимают участие в первичном почвообразовательном процессе. В основном это свободноживущие формы, но есть и симбионты.

*Археи* отличаются от бактерий составом ряда клеточных компонентов (клеточной стенки, мембранных липидов) и физиологических свойств. Они обнаруживаются в местах с экстремальными условиями, аналогичными условиям архейской эры.

Среди архей имеются литоавтотрофы, т. е. организмы, окисляющие неорганические соединения, а в качестве источника углерода использующие  $CO_2$ ; гетеротрофы, аэробные и анаэробные формы.

В биотехнологии используются *метаногенные бактерии*, относящиеся к археям. Метаногенные бактерии представляют гетерогенную по морфологии группу: палочки, кокки или спириллы. Они являются облигатными анаэробами. Это специализированная физиологическая группа микроорганизмов. Энергию для роста они получают путем восстановления  $CO_2$ , с использованием электронов, освобождающихся при окислении водорода или формиата. Обитают метаногены в илах пресных и соленых водоемов, в болотах, на стволах деревьев, в желудочно-кишечном тракте животных (особенно жвачных), а также рыб и насекомых. В природе метаногены завершают анаэробное разложение природных биополимеров и входят в состав метаногенных сообществ микроорганизмов, расщепляющих целлюлозу, крахмал, белки.

Метанобразующие бактерии широко используются в биотехнологических процессах для утилизации избыточного активного ила очистных сооружений, микробных биомасс, растительных целлюлозосодержащих отходов, отходов животноводческих комплексов и птицефабрик.

*Галобактерии* – уникальная группа архей, обитающая в соленых водоемах. Оптимальными условиями для их развития являются среды, содержащие 3,5–5,0 М NaCl. По морфологии галобактерии могут быть кокковидными или в форме неправильных палочек. Галобактерии – хемоорганогетеротрофы, но способны и к фотосинтезу без участия хлорофилла в присутствии особого белка – *бактериородопсина*. В настоящее время разработана технология получения родопсина из биомассы галобактерий (рис. 2.15).





Рис. 2.15. Галобактерии (сканирующая электронная микроскопия)

Широкое применение в биотехнологии находят грибы, эукариоты, органогетеротрофы, относящиеся к разным систематическим группам. Характерной особенностью грибов является их способность синтезировать активные гидролитические экзоферментные комплексы, осуществляющие расщепление сложных природных целлюлозосодержащих, белоксодержащих, кератинсодержащих и др. полимеров. Именно эти физиолого-биохимические особенности грибов определяют их глобальную роль в природе и широкое использование в биотехнологии.

В природных трофических цепях они выполняют роль редуцентов, минерализующих природные биополимеры, синтезируемые живыми организмами. Большинство грибов являются сапрофитами, многие способны паразитировать на разных видах живых организмов, а также вступать в симбиотические отношения с высшими растениями (микоризные грибы) и микроскопическими водорослями (лишайники).

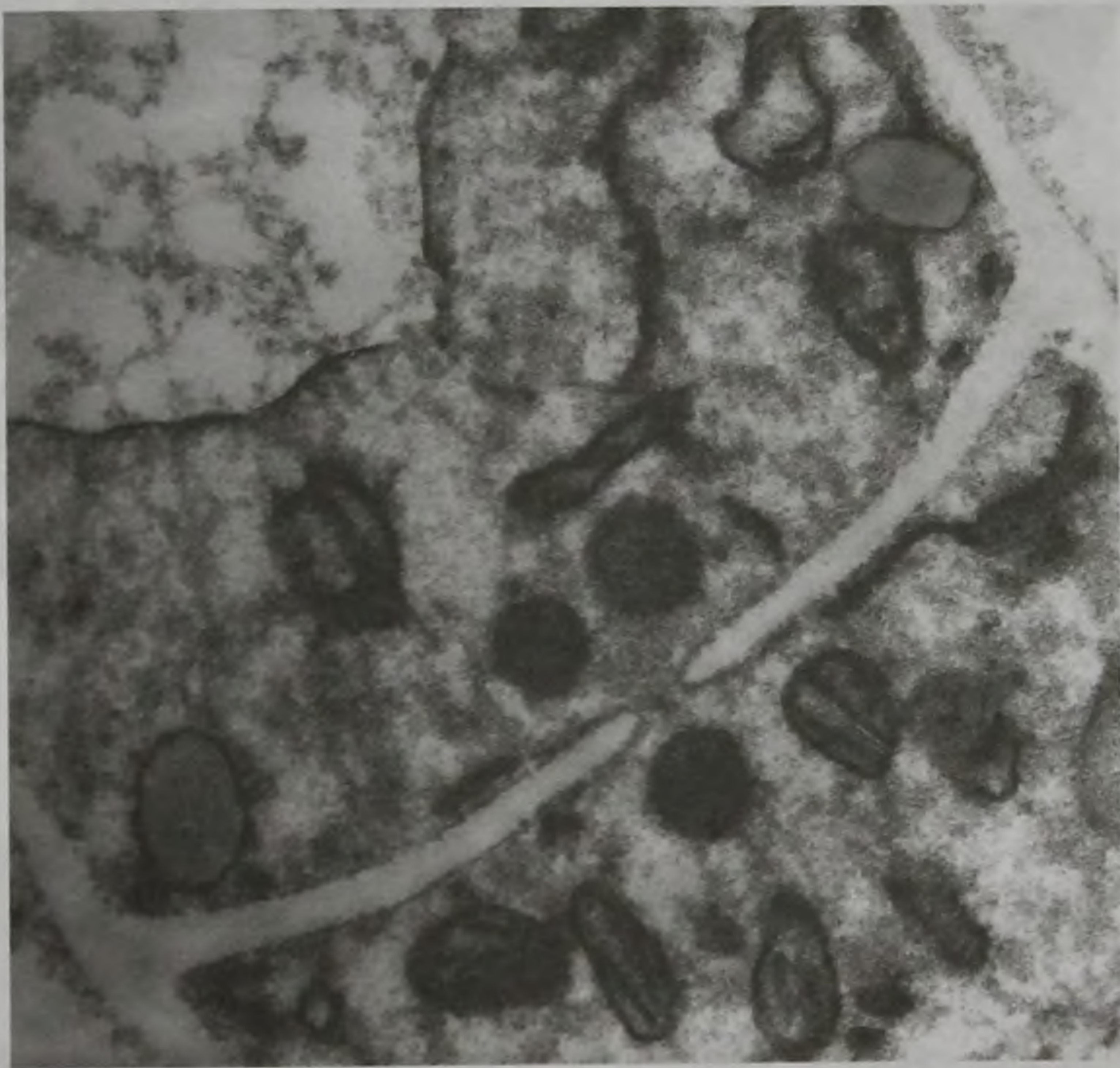
Кроме сапрофитных, среди грибов имеются хищные и ядовитые грибы. Многие виды патогенны для человека и животных.

Характерной особенностью грибов является их способность синтезировать помимо ферментов и другие биологически активные вещества, такие как антибиотики, токсины, афлатоксины и др.

Большинство грибов – ценоцитные (многоядерные) организмы, цитоплазма которых непрерывна, и они растут, не претерпевая клеточных делений (рис. 2.16). Вегетативное тело гриба составляет мицелий, представляющий собой многоядерную массу цитоплазмы, наполняющую разветвленную систему жестких трубочек (гиф) примерно одинаковой толщины с разнообразным типом ветвления. Обычно мицелий образуется путем прорастания и разрастания одиночной репродуктив-



ной клетки – споры. При прорастании грибная спора дает длинную нить, или гифу. Рост грибов происходит только за счет кончиков гиф. Размеры единичного мицелия неограниченны; периферический рост путем удлинения гиф может продолжаться до тех пор, пока хватает питательных веществ. У некоторых грибов отдельный мицелий может достигать макроскопических размеров. Мицелий можно рассматривать как одну большую клетку, в цитоплазме которой в большем или меньшем порядке расположены ядра. Бесполое размножение, как правило, происходит путем образования одноядерных или многоядерных спор, которые отшнуровываются на концах гиф.



**Рис. 2.16.** Ценоцитная структура мицелиального гриба, имеется септа с порой (электронная микроскопия)

В зависимости от способа размножения выделяют телеоморфные грибы. Совершенную стадию размножения (половую) имеют грибы аскомицеты, базидиомицеты, зигомицеты. Несовершенные грибы рассматриваются как анаморфа по отношению к телеоморфным грибам.

В классификации грибов используется принцип присвоения разных родовых названий телеоморфным и анаморфным формам.



Плесневые грибы р. *Penicillium* (рис. 2.17) используются в биотехнологии для получения антибиотиков. Разные виды грибов р. *Aspergillus* – для получения ряда продуктов: *Aspergillus niger* (рис. 2.18) – для получения целлюлитических ферментов, лимонной кислоты и др.; грибы р. *Trichoderma* (рис. 2.19) – для получения ферментов целлюлолитического комплекса; грибы *Blakeslea trispora* – каротиноидов; гриб *Beauveria bassiana* (рис. 2.20) – средства борьбы с вредными для растений насекомыми; грибы р. *Fusarium* (рис. 2.21) используются как продуценты гиббереллинов, стимулирующих рост растений.

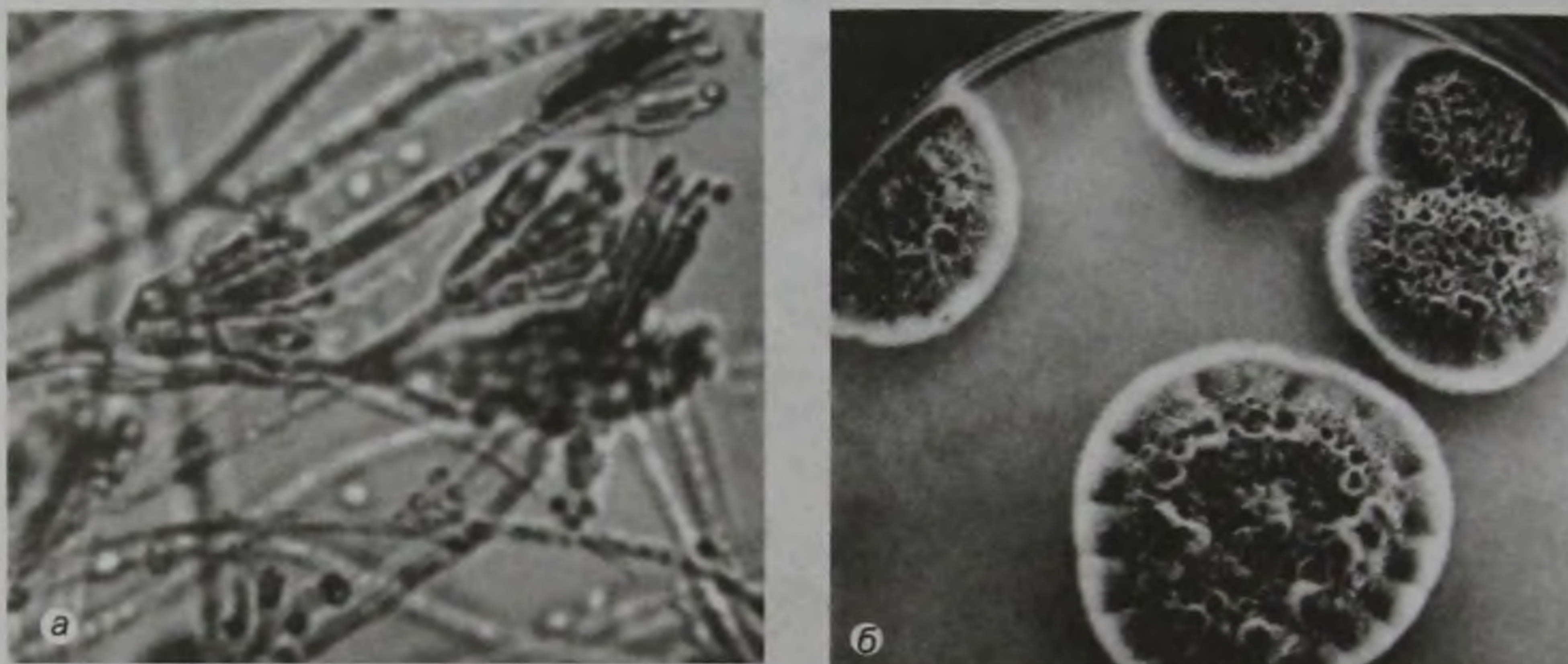


Рис. 2.17. *Penicillium*:

а – конидиеносцы, на вершине мутовчато-разветвленные; б – колонии на плотной среде

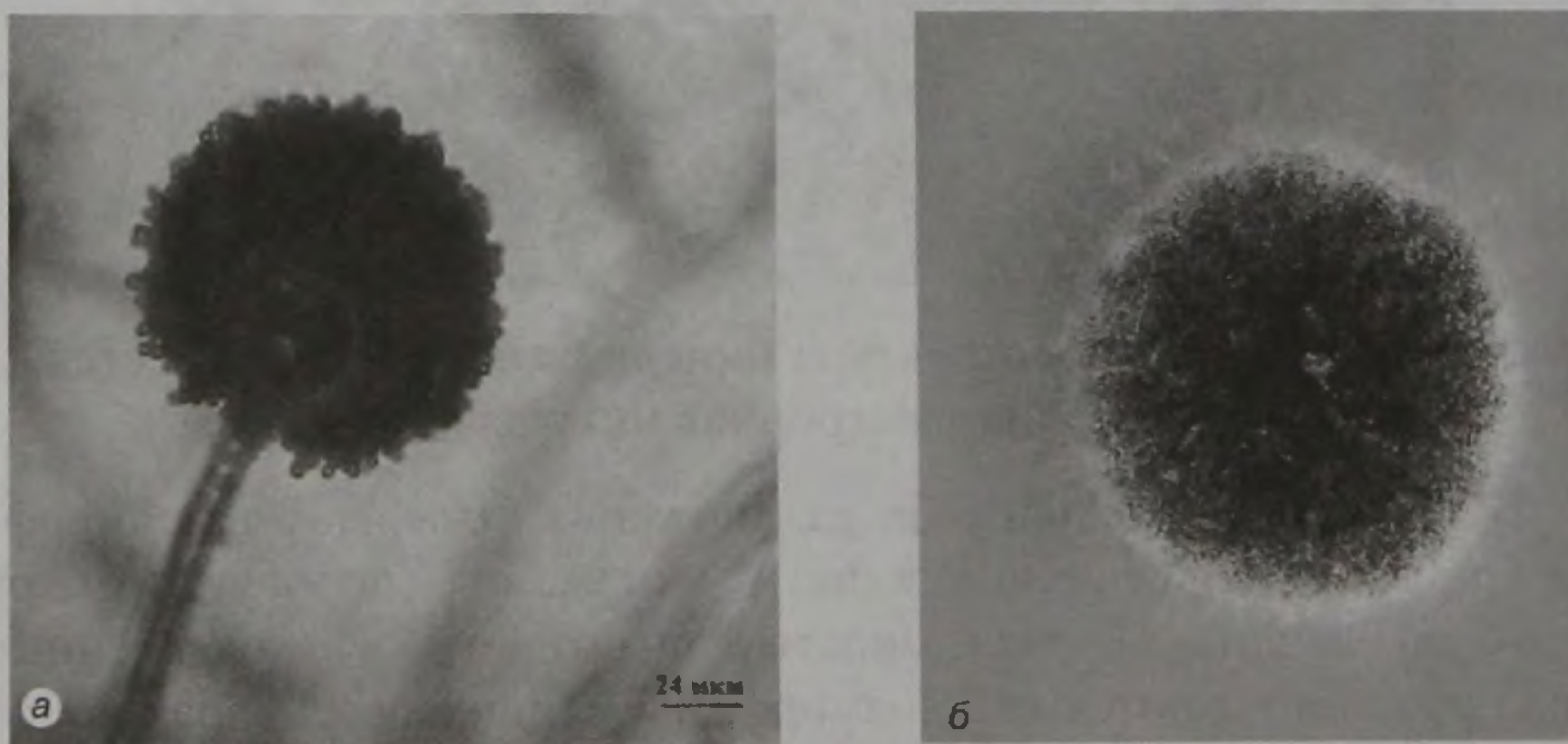


Рис. 2.18. *Aspergillus niger*:

а – конидиальная головка; б – колония на плотной среде (по А.А. Широких и др., 2004)



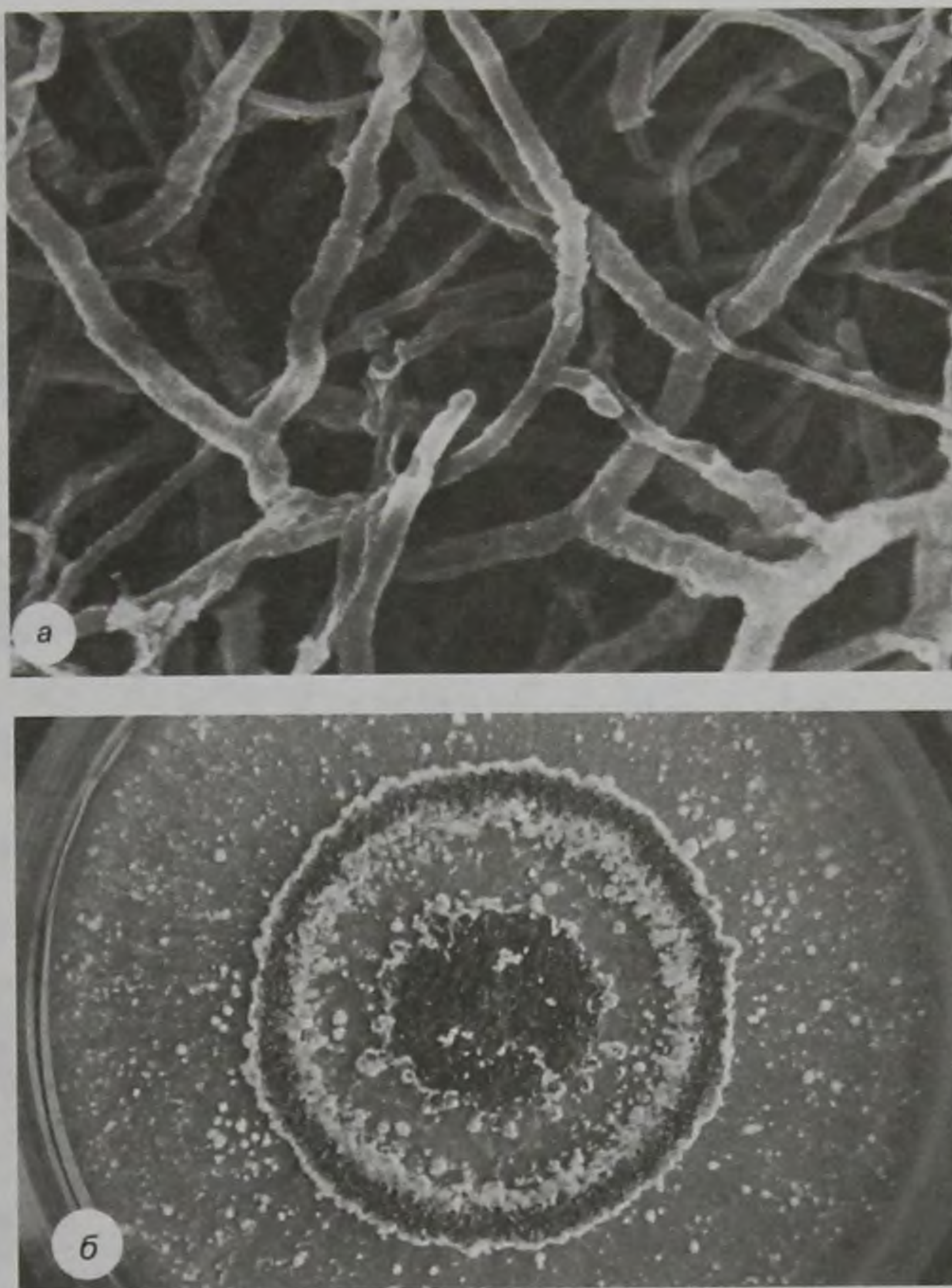


Рис. 2.19. *Trichoderma viride*:

*a* – мицелий (сканирующая электронная микроскопия); *б* – колония на плотной среде

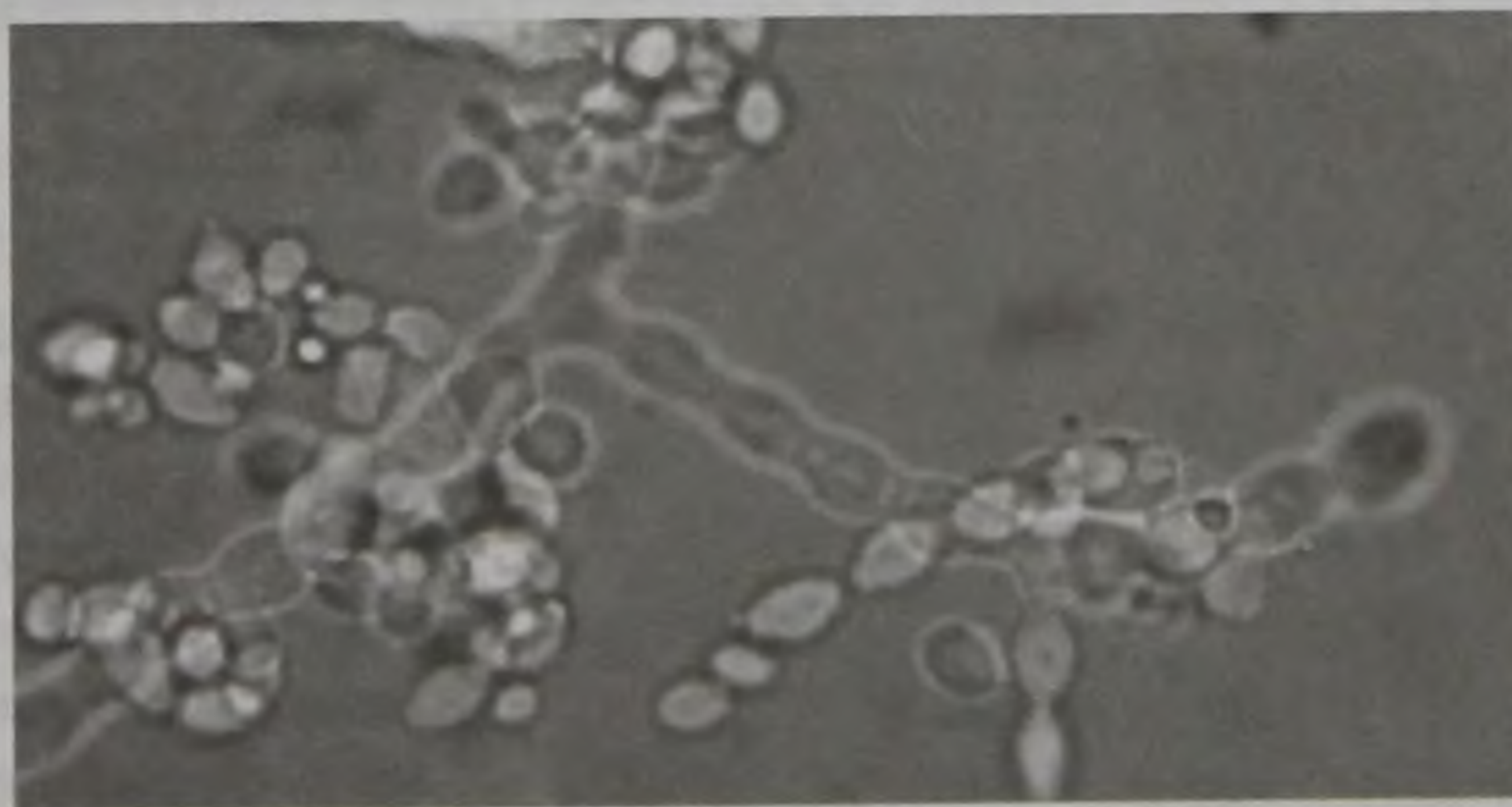
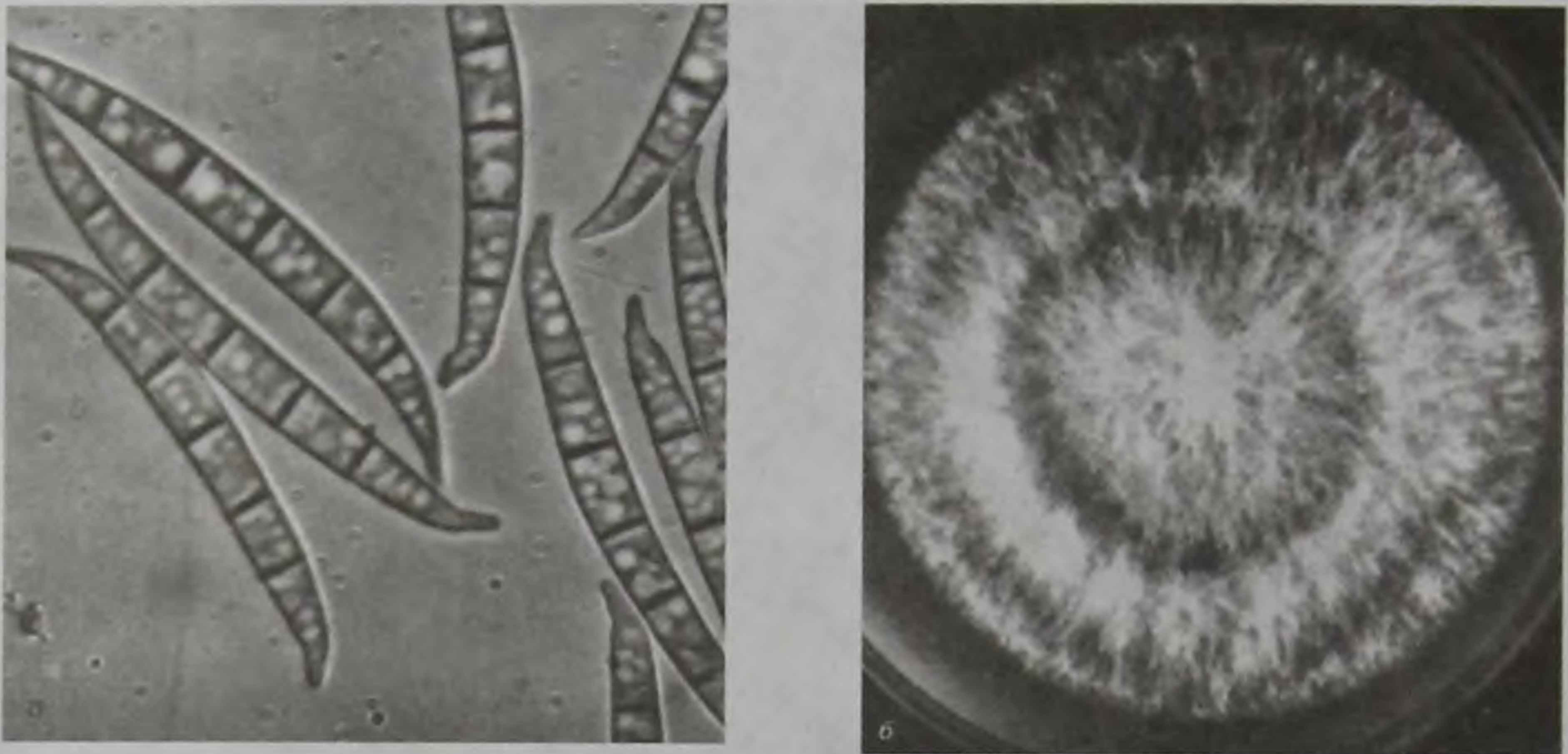


Рис. 2.20. *Beauveria bassiana*

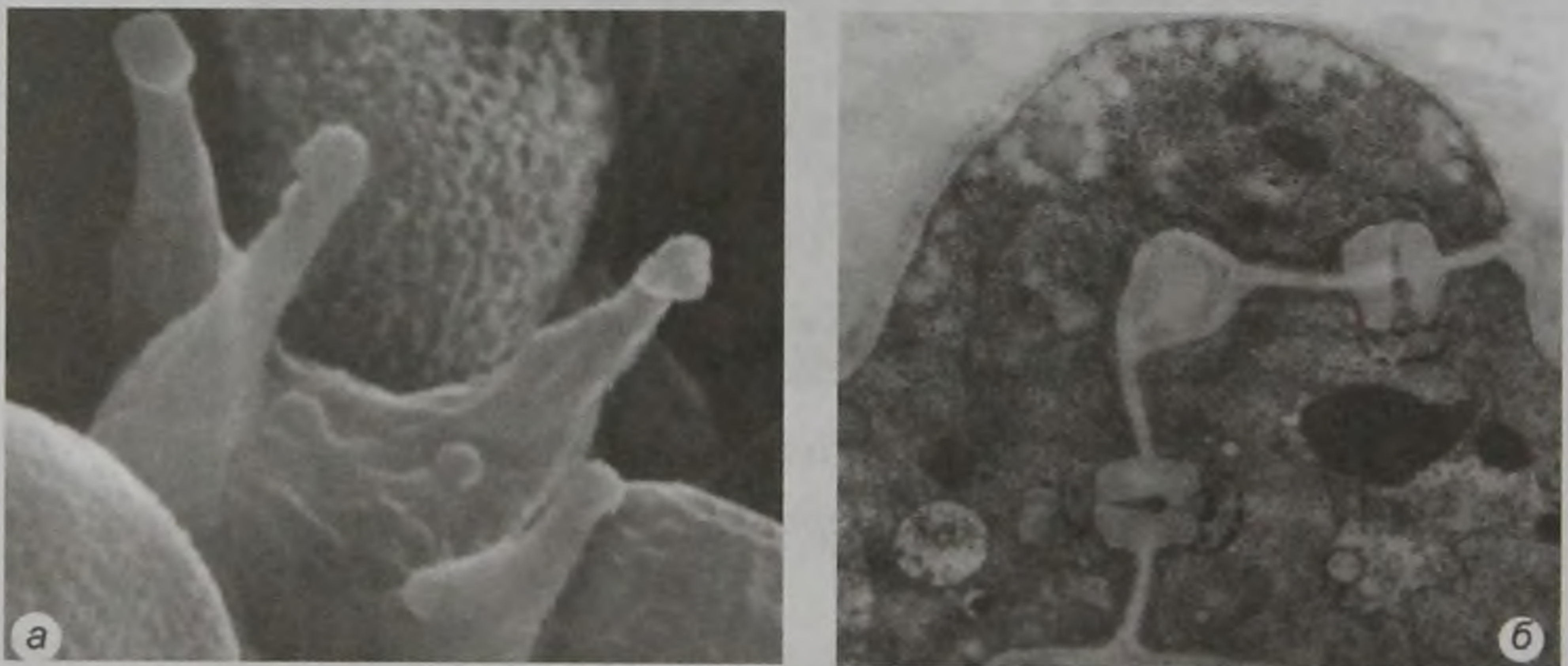




**Рис. 2.21. *Fusarium*:**

*а* – серповидные конидии; *б* – колония на плотной среде

Для получения биомассы грибов для пищевых целей применяются высшие грибы – базидиомицеты (рис. 2.22).



**Рис. 2.22. *Pleurotus ostreatus*:**

*а* – созревание базидиоспор на базидиях (сканирующая электронная микроскопия); *б* – «пряжка» на мицелии (электронная микроскопия); *в* – плодовые тела





В крупнотоннажных производствах широко применяются дрожжи.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 2.23) и *S. carlsbergensis* испокон веков эмпирически использовались человеком. В настоящее время они используются в пищевой и хлебопекарной промышленности, для получения этанола, при производстве вина, пива, при переработке отходов пищевой промышленности, мелассы, молочной сыворотки и др.

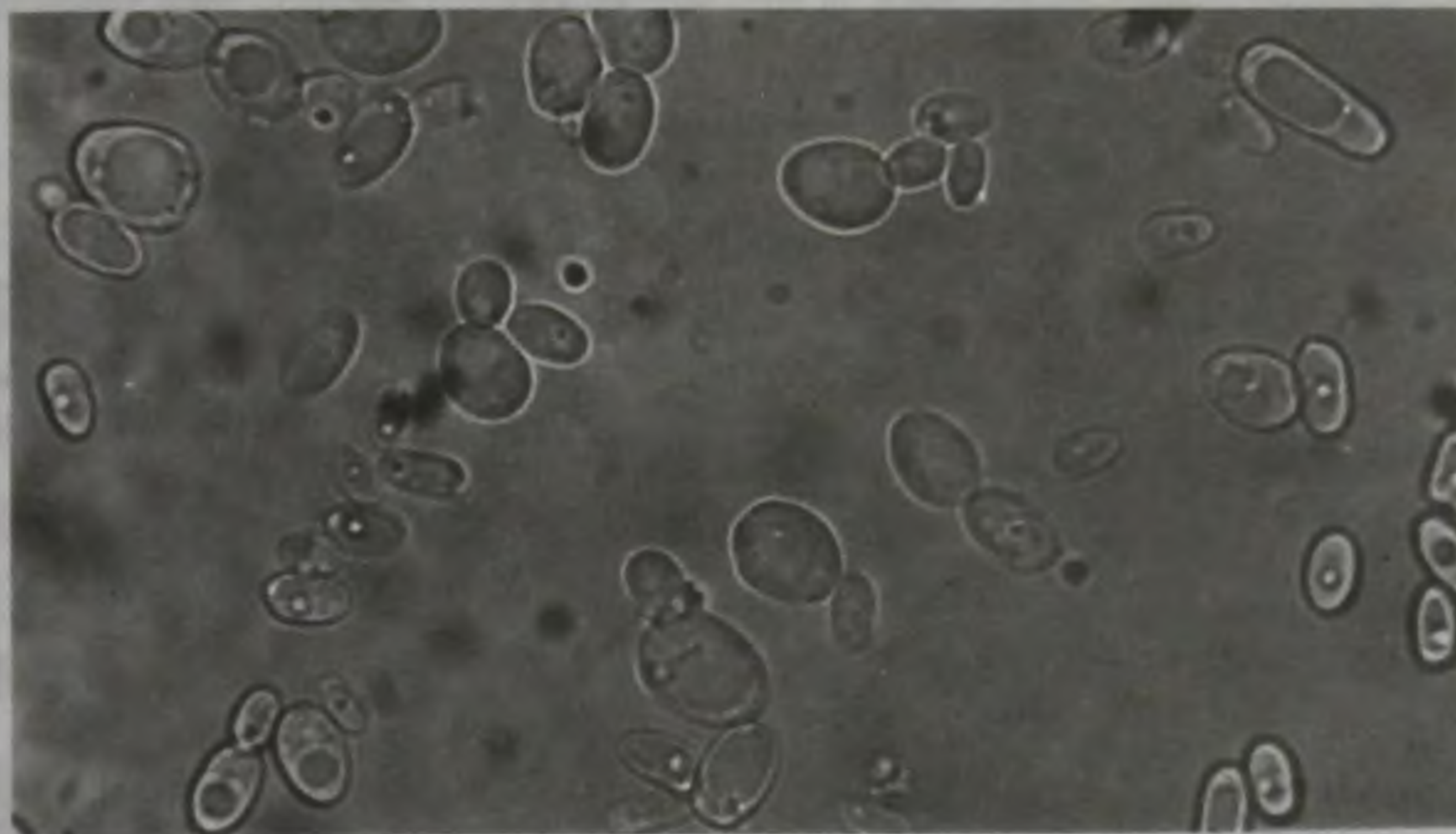


Рис. 2.23. *Saccharomyces cerevisiae*

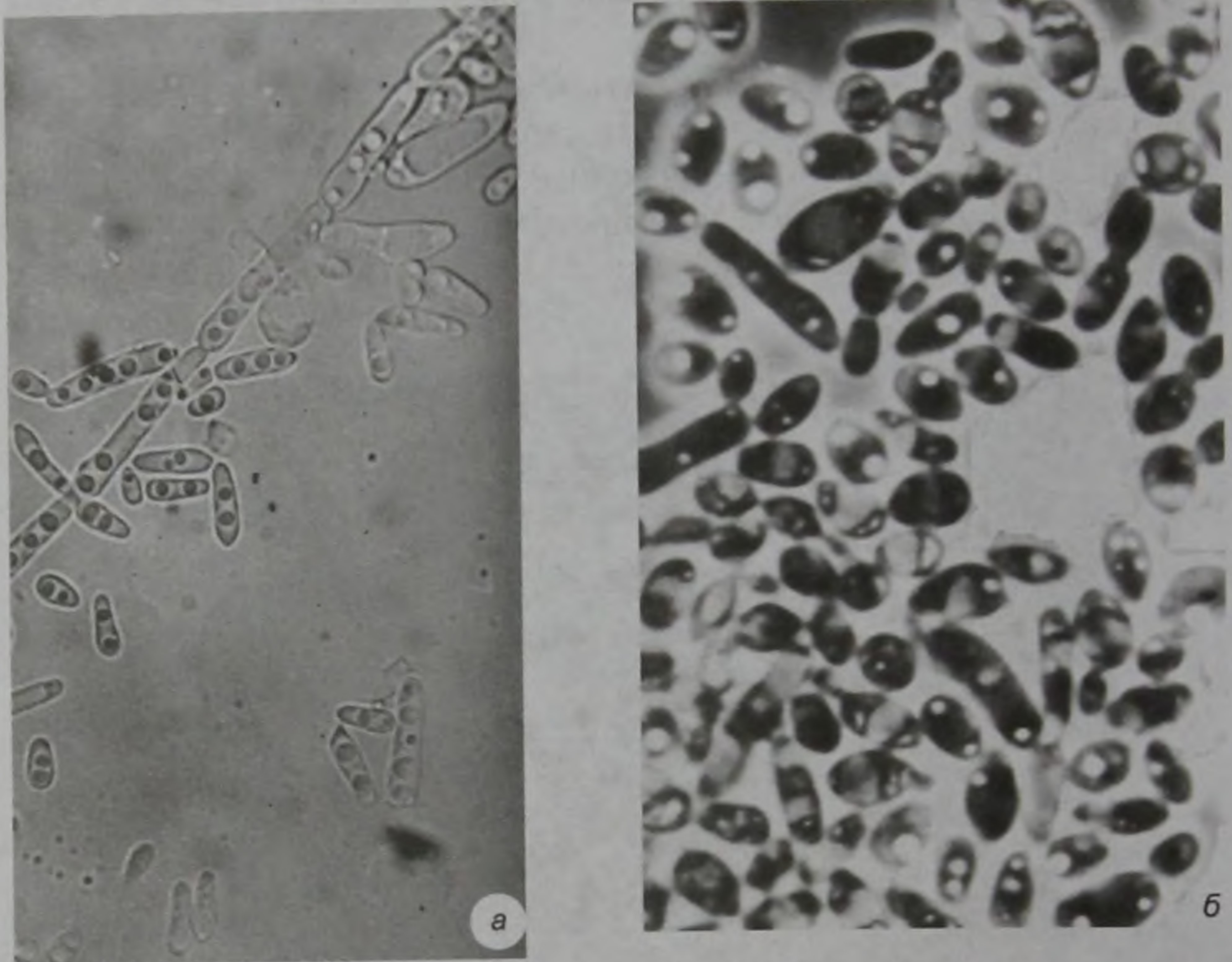
Дрожжи р. *Candida*, *C. maltosa*, *C. utilis*, *C. tropicalis* (рис. 2.24) и другие нашли широкое применение в крупнотоннажных производствах при культивировании на разных видах сырья: на n-парафинах, нефтяных дистиллятах, этаноле, гидролизатах древесного и растительного сырья. Дрожжевая биомасса используется как белково-витаминная кормовая добавка.

Углевородородокисляющие дрожжи применяются в качестве препаратов или как компонент препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных природных и техногенных сред и потоков.

Среди дрожжей р. *Candida* имеются условно-патогенные формы, а дрожжи *C. albicans* – патогенны для человека (рис. 2.25).

В биотехнологии, помимо процессов, основанных на жизнедеятельности популяции определенного вида микроорганизмов, широко используются ассоциативные культуры и биоценозы, представленные микроорганизмами разных видов и родов, связанных как трофическими связями, так и другими типами взаимоотношений (симбиотическими и др.).





**Рис. 2.24.** Промышленные штаммы дрожжей:  
*а* – *Candida tropicalis*; *б* – *Candida maltosa*



**Рис. 2.25.** *Candida albicans* с хламидоспорами на псевдомицелии  
(по И.П. Бабьевой и др., 2004)

Ассоциативные, эволюционно сложившиеся культуры микроорганизмов применялись человеком с древнейших времен (закваски для выпечки хлеба, для получения кисломолочных продуктов, вина, пива



и т. п.). В настоящее время используются искусственные ассоциативные культуры, включающие специально селекционированные микробные компоненты (пивоварение, виноделие, силосование, препараты для биоремедиации загрязненных природных и техногенных сред).

Сложные ассоциативные культуры применяются в системах биологической очистки сточных вод (активные илы), газовоздушных выбросов (биофильтры), как микроудобрения и препараты для рекультивации земель, выведенных из хозяйственного использования, для повышения нефтеотдачи пластов и др.

Находят применение в биотехнологии и одноклеточные водоросли. *Chlorella vulgaris* (рис. 2.26) используется для получения кормовой биомассы в южных странах с интенсивной солнечной радиацией (Япония, Латинская Америка и др.).

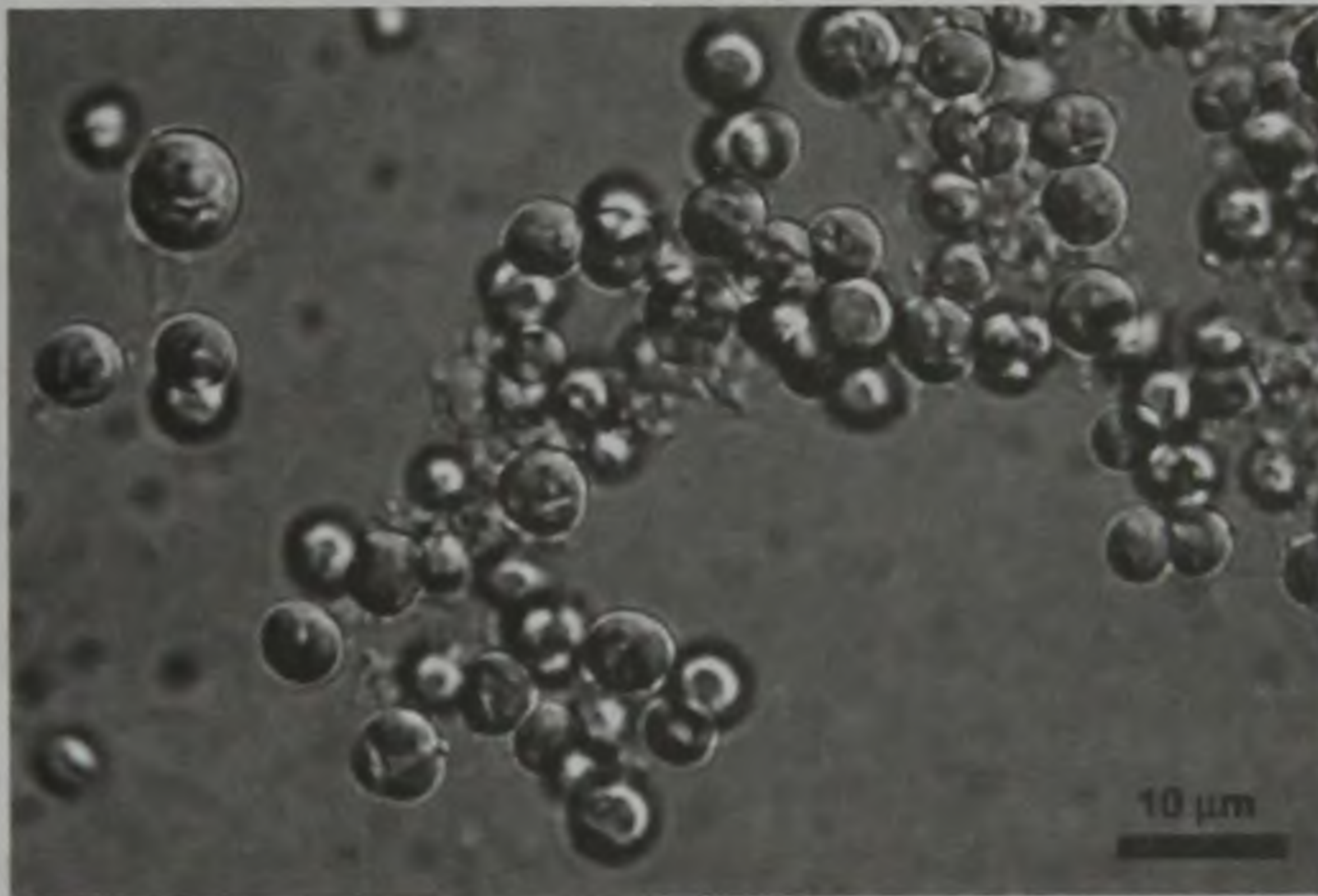


Рис. 2.26. *Chlorella vulgaris*

Простейший организм инфузория *Tetrachimena peryformis* (рис. 2.27) широко используется в качестве тест-объекта для первичной оценки биологической ценности и безвредности пищевых и кормовых продуктов.

Помимо микроорганизмов, в биотехнологии используются клеточные культуры высших эукариотов, культивируемые *in vitro* изолированные клетки многоклеточных организмов, животных и растений.

Использование клеточных культур открывает широкие возможности для развития новых направлений биотехнологии. Так, например, эукариотические белки с регуляторными свойствами, предназначенные для медицинского применения, возможно получить только при использовании эукариотов. В эукариотическом организме та-



кие белки, как правило, подвергаются посттрансляционной модификации, наиболее распространенной реакцией которой является гликозилирование. У микроорганизмов система гликозилирования практически отсутствует, а без такой модификации белковые продукты часто оказываются подверженными повреждающему воздействию ферментов организма. В других случаях гликозилирование оказывается необходимым для поддержания активной конформации белка.

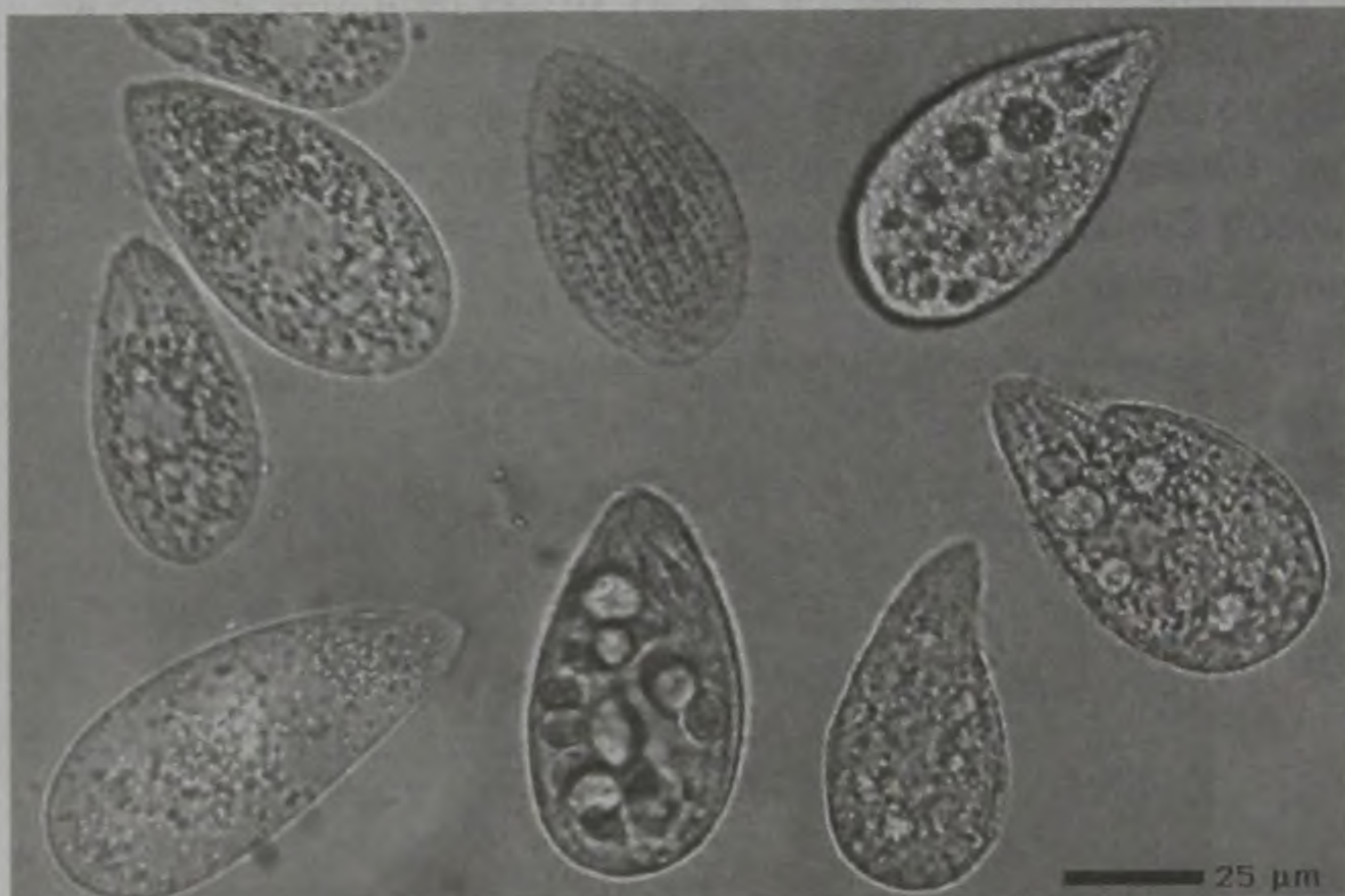


Рис. 2.27. *Tetrahymena pyriformis*

Культивируемые *in vitro* клетки растений являются перспективными продуцентами лекарственных и других ценных веществ для пищевой, фармацевтической и парфюмерной промышленности. Клеточные культуры растений успешно применяются для быстрого размножения сельскохозяйственных растений.

На основе культуры клеток животных разработаны методы получения моноклональных антител (антитела, полученные из одного клона лимфоцитов и связывающие только один белок). Этот метод позволяет получать антитела против определенных антигенов, которые используются в медицине для ранней и быстрой диагностики различных заболеваний человека, в том числе и онкологических.

На основе культуры тканей животных получают многие лекарственные препараты: интерферон, соматотропин (гормон роста человека), лизоцим, урокиназу, вакцину против гепатита В и др. Клеточные культуры животных используют для выращивания вирусов и получения вакцин.



Биотехнологические процессы использования вирусов направлены на разработку способов их культивирования для диагностики вирусных инфекций и для создания противовирусных вакцин и препаратов против вирусов, возбудителей инфекционных заболеваний человека, животных и растений.

Вирусы находят широкое применение для получения вакцин и энтомопатогенных препаратов.

Вирусы – неклеточные организмы, облигатные генетические паразиты. Структура вирусов – это молекула нуклеиновой кислоты (либо РНК, либо ДНК), окруженная белковой оболочкой (капсидом). Вирусы существуют в двух формах: внеклеточная форма – вирион, внутриклеточная форма – реплицирующаяся молекула нуклеиновой кислоты.

Вирусы бактерий называются фагами. Фаги имеют специфическую структуру, что связано с механизмом проникновения в бактериальную клетку ДНК-фагов при использовании механизма типа шприца.

Цикл репродукции фагов в клетке хозяина может завершиться менее чем за 1 час. Возможное количество образуемых фаговых частиц в одной клетке – до 200.

В последние годы бурными темпами развиваются геномные технологии. XXI век рассматривается как время наступления геномной эры.

Новейшие методы молекулярной биологии сделали возможным передачу в организм-реципиент практически любого гена другого организма-донора, что дает возможность передачи микроорганизму (реципиенту) одного или нескольких новых признаков, а также изъятия или модификации ранее принадлежащих ему свойств и открывает невиданные ранее возможности в расширении спектра получаемых продуктов, в повышении эффективности биотехнологических препаратов и процессов.

Широкомасштабные исследования проводятся по разработке научных основ и практическому созданию *генетически модифицированных микроорганизмов (ГММ)*. Процессы, приводящие к изменению ДНК в результате внедрения чужеродного гена, в природных условиях широко распространены и связаны они с процессами конъюгации, трансдукции и трансформации. В процессах конъюгации большую роль играют плазмиды. В процессах трансдукции бактериофаги обогащают популяции чувствительных клеток новой генетической информацией – хромосомными генами и плазмидами. Большое значение придается процессу трансформации как фактору генетического обмена в природе, роль которого может быть не меньше, чем роль конъюгации и трансдукции в эволюции бактерий. Условия для процесса



трансформации имеются как в почве, так и в воде. Распад бактерий, происходящий в окружающей среде, приводит к постоянному поступлению в природные среды свободной ДНК. Имеются данные о том, что «хромосомная» или «плазмидная» трансформация могут эффективно происходить и при прямом контакте бактерий.

Генетиками сконструирован ряд практически полезных форм ГММ: штаммы бактерий, способные поглощать и связывать влагу атмосферы, трансгенные эффективные азотфиксаторы, трансгенные биопестициды, штаммы, очищающие от загрязняющих веществ природные среды и др.

Одним из перспективных и наиболее развивающихся направлений агропроизводства является получение трансгенных растений. Получение растений, обладающих многими полезными для человека признаками, не может быть решено традиционными методами селекции, и, кроме того, при использовании таких методов потребовались бы годы, а иногда и десятилетия. Создание трансгенных растений, обладающих нужными свойствами, требует гораздо меньше времени, чем традиционная селекция и позволяет получать растения с заданными хозяйственно-ценными признаками, а также обладающих свойствами, не имеющими аналогов в природе. Примером последнего могут служить полученные методами генной инженерии сорта растений, обладающие повышенной устойчивостью к засухе.

В настоящее время работы в области создания трансгенных растений направлены на:

- получение сортов сельскохозяйственных культур с более высокой урожайностью;
- получение сельскохозяйственных культур, дающих несколько урожаев в год (например, ремонтантные сорта клубники);
- получение сельскохозяйственных культур, обладающих токсичностью для некоторых видов вредителей (например, сортов картофеля, листья которого токсичны для колорадского жука и его личинок);
- получение сельскохозяйственных культур, устойчивых к неблагоприятным климатическим условиям (например, устойчивые к засухе растения, имеющие в своем геноме ген скорпиона);
- создание сортов растений, способных синтезировать некоторые белки животного происхождения (например, сорт табака, синтезирующий лактоферрин человека).

Создание трансгенных растений позволяет решить не только агротехнические и продовольственные проблемы, но и ряд техноло-



гических и фармакологических, позволит прекратить или значительно уменьшить использование пестицидов и других видов ядохимикатов, которые могут нарушать естественный баланс в локальных экосистемах.

### **Контрольные вопросы**

1. Основные объекты биотехнологии.
2. Основные направления использования бактерий в биотехнологии.
3. Основные направления использования дрожжей в биотехнологии.
4. Основные направления использования грибов в биотехнологии.
5. Основные направления использования водорослей в биотехнологии.
6. Основные направления использования простейших в биотехнологии.
7. Основные направления использования культуры тканей растений в биотехнологии.
8. Основные направления использования культуры тканей животных в биотехнологии.
9. Основные направления использования вирусов в биотехнологии.
10. Практическое использование генномодифицированных микроорганизмов.



### **3. Биотехнологические производства. Технологические схемы. Источники эмиссии**

Биотехнологическое производство представляет собой последовательно выполняемые стадии, число, последовательность и специфика которых определяются многими факторами: особенностями используемого биообъекта, сырьем, характером целевого продукта (рис. 3.1).

Несмотря на большое разнообразие технологических схем (рис. 3.2, 3.3), все они включают ряд общих стадий. К ним относятся:

- подготовка посевного материала (инокулята);
- приготовление питательной среды для культивирования биообъекта;
- основная стадия – культивирование (выращивание) биообъекта;
- получение целевого продукта.

Культивирование биообъекта осуществляется различными способами:

- глубинное – периодическое или непрерывное культивирование; в аэробных или анаэробных условиях;
- гетерофазное;
- поверхностное культивирование;
- культивирование биообъекта в иммобилизованном виде.

Для активного роста микроорганизмов в питательную среду вводят биогенные элементы: углерод, азот и фосфор, а также макро- и микроэлементы (в основном в виде удобрений или технических солей). В качестве источника углерода в промышленных условиях, помимо индивидуальных органических соединений (глюкозы, сахарозы, лактозы и др.), используются сложные органические субстраты – как правило, отходы пищевой промышленности, сельского хозяйства и других видов промышленности. Такими органическими субстратами могут быть: гидролизаты мясных продуктов, му-



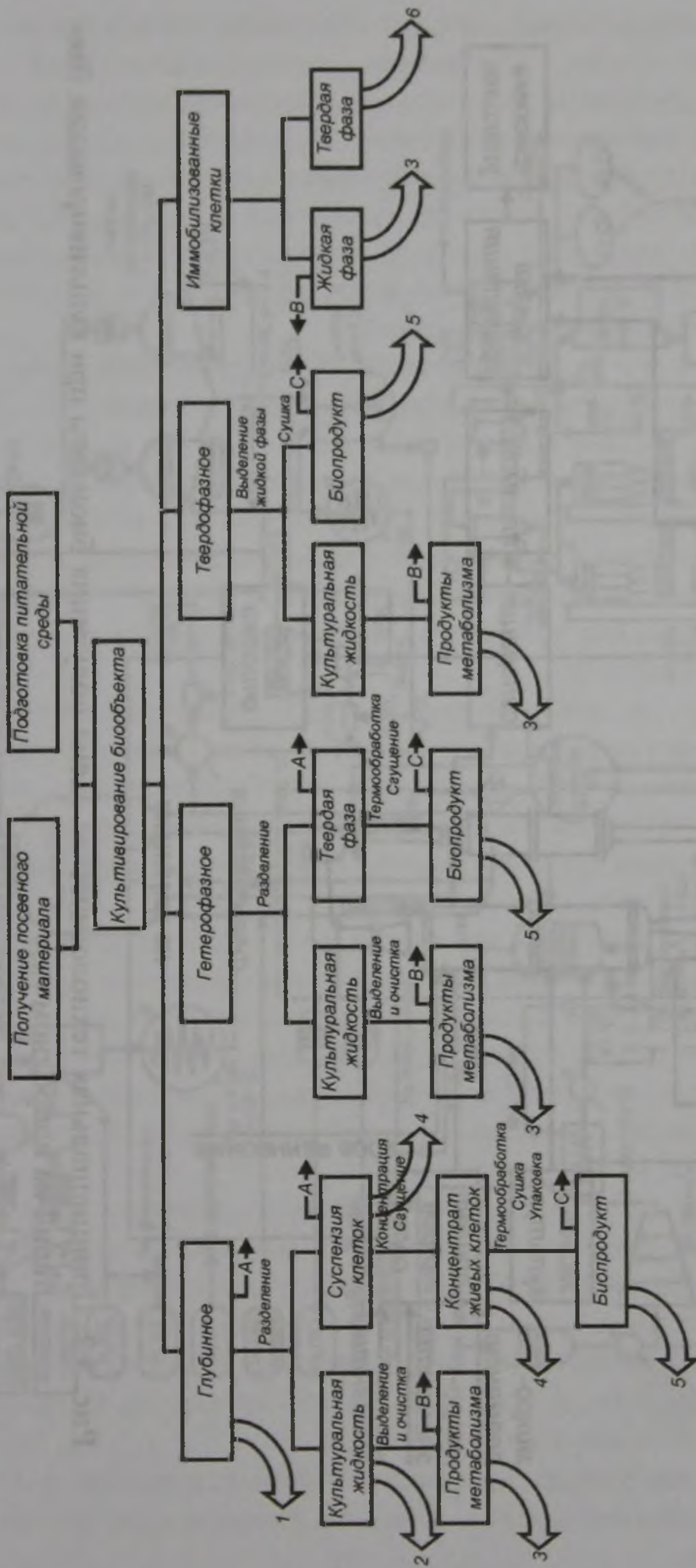
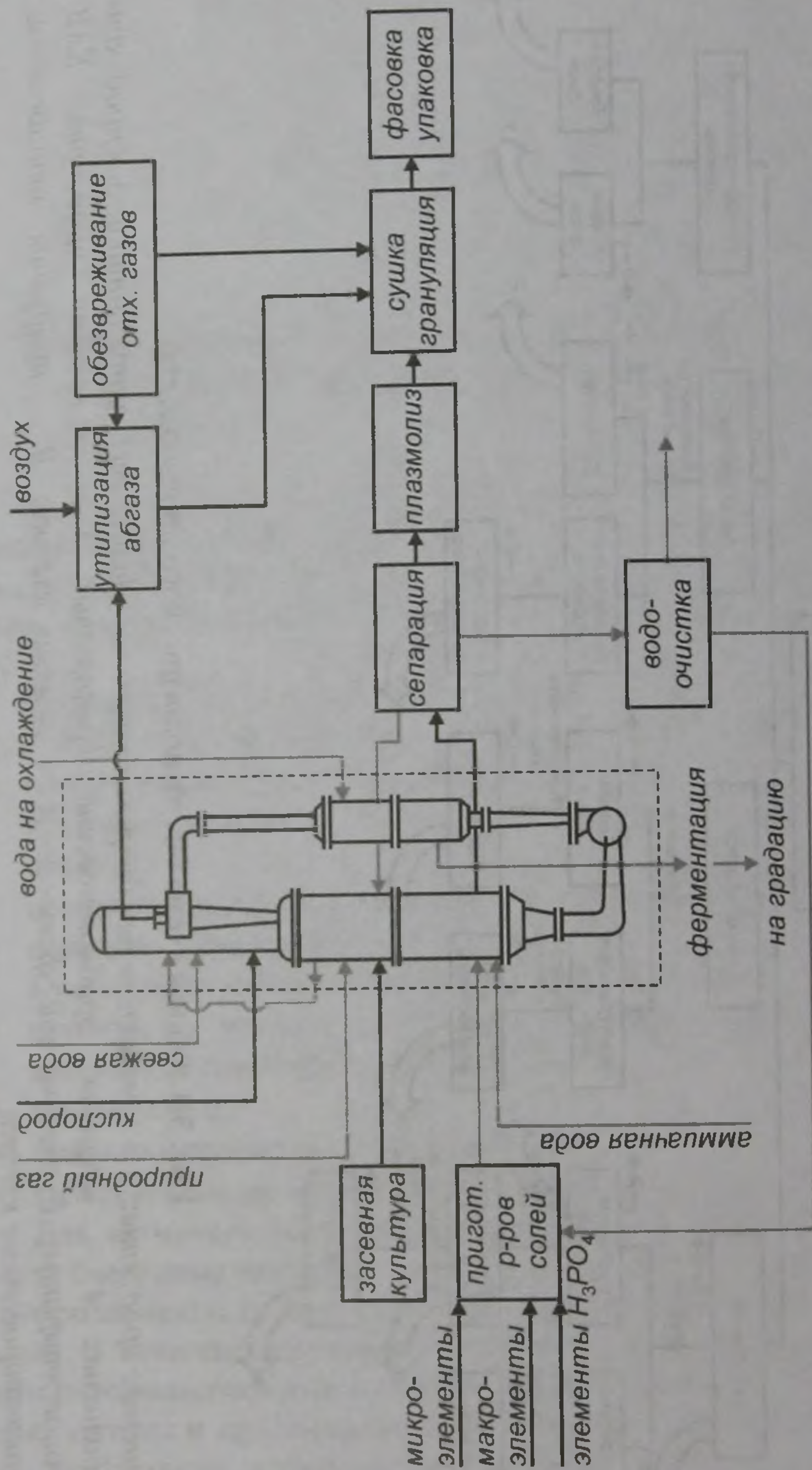


Рис. 3.1. Общая схема биотехнологического производства:

Получаемые продукты: 1 – препараты для биоремедиации; 2 – ферменты, антибиотики; 3 – продукты метаболизма; 4 – вакцины, пробиотические препараты; 5 – кормовые продукты, БАВ; 6 – биопрепараты. Биологический фактор: А – живые клетки; В – продукты метаболизма; С – инактивированные клетки





**Рис. 3.2.** Принципиальная технологическая схема получения биомассы при культивировании бактерий на природном газе



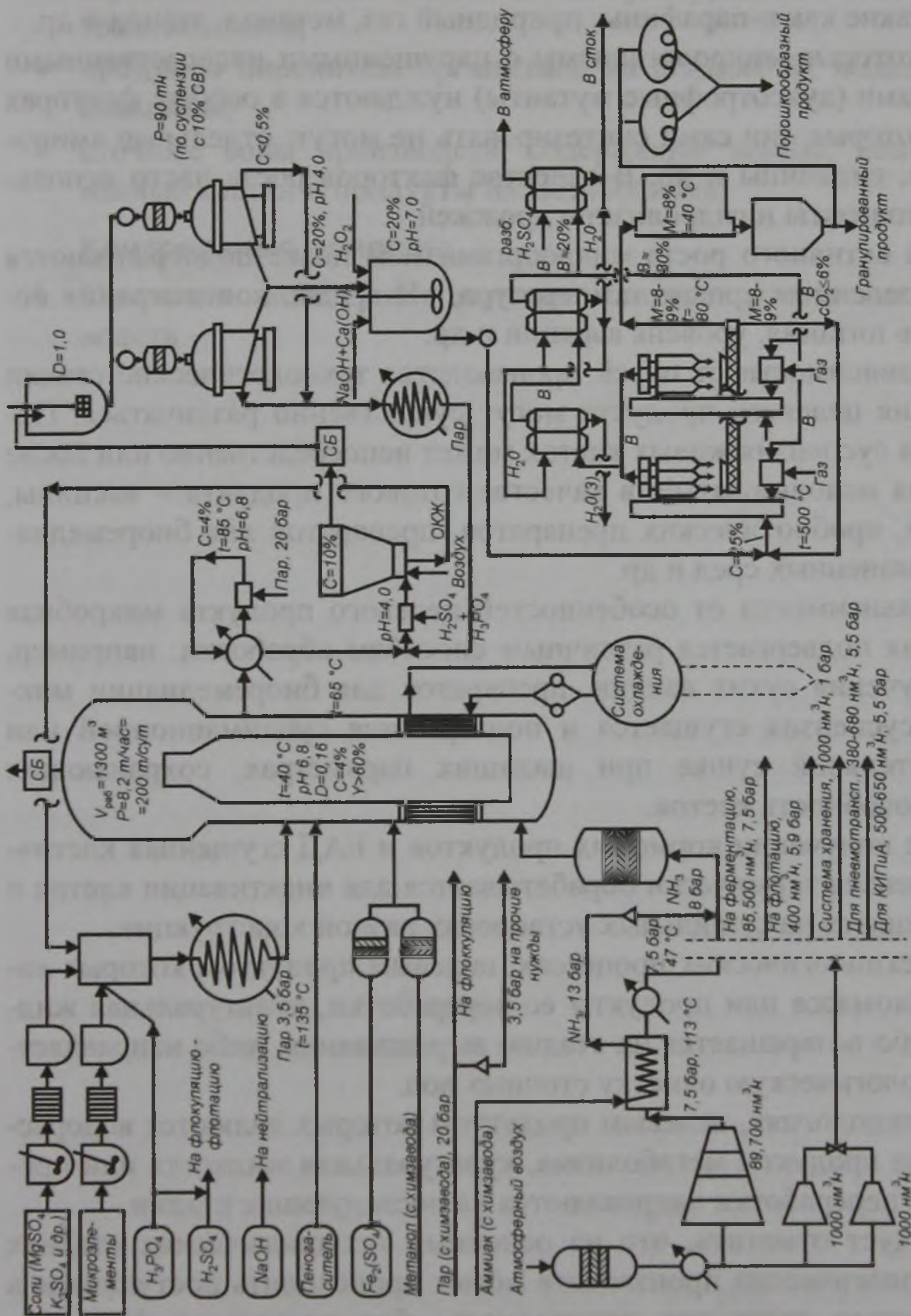


Рис. 3.3. Технологическая схема фирмы IC1 (Англия) получения биомассы при культивировании бактерий на метаноле



ка зерновых культур, крахмал, меласса, молочная сыворотка, мясокостная мука, рыбная мука, гидролизаты соломы, подсолнечной лузги, гидролизаты древесины, торфа, а также промышленные виды сырья, такие как *n*-парафины, природный газ, метанол, этанол и др.

Некоторые микроорганизмы с нарушенными наследственными признаками (ауксотрофные мутанты) нуждаются в особых факторах роста, которые они сами синтезировать не могут: отдельные аминокислоты, витамины и др. В качестве факторов роста часто используют автолизаты и гидролизаты дрожжей.

Для активного роста микроорганизмов также поддерживаются на определенном уровне температура, рН среды, концентрация источников питания, уровень аэрации и др.

В зависимости от целей производства технологические стадии получения целевого продукта могут существенно различаться. Полученная суспензия живых клеток может непосредственно или после сгущения использоваться в качестве готового продукта – вакцины, закваски, пробиотических препаратов, препаратов для биоремедиации загрязненных сред и др.

В зависимости от особенностей целевого продукта микробная суспензия подвергается различным способам обработки: например, для получения сухих вакцин, препаратов для биоремедиации микробная суспензия сгущается и подвергается сублимационной или распылительной сушке при щадящих параметрах, сохраняющих жизнеспособность клеток.

При получении кормовых продуктов и БАД сгущенная клеточная суспензия термически обрабатывается для инактивации клеток и далее сушится на сушильных установках разной конструкции.

В технологических процессах, целевым продуктом которых является биомасса или продукты ее переработки, культуральная жидкость либо возвращается на стадию выращивания, либо направляется на биологическую очистку сточных вод.

В технологиях, целевым продуктом которых являются водорастворимые продукты метаболизма, культуральная жидкость или продукты ее переработки направляются на последующие стадии.

Следует отметить, что на основных технологических стадиях биотехнологических производств может происходить поступление в окружающую среду так называемого «биологического фактора», основными источниками которого являются:

- аэрозоль газовоздушных выбросов от ферментационного оборудования стадий отделения и сгущения биомассы, содержащий живые клетки;



- аэрозоль от сушильных установок, содержащий инактивированные клетки;
- аэрозоль на стадиях выделения из культуральной жидкости экзометаболитов;
- продукты биосинтеза организмов на стадиях их выделения из биомассы;
- сточные воды производств, содержащие живые, инактивированные клетки и продукты их метаболизма.

### Контрольные вопросы

1. Основные источники эмиссии биотехнологических производств.



## **4. Санитарно-гигиеническая характеристика «биологического фактора»**

Возможность воздействия на человека и окружающую среду «биологического фактора» является специфической гигиенической, эпидемиологической, токсикологической и экологической особенностью биотехнологии.

«Биологический фактор» – это совокупность биологических объектов, воздействие которых на человека или окружающую среду связано с их способностью размножаться в естественных или искусственных условиях, или продуцировать биологически активные вещества и оказывать неблагоприятное влияние на здоровье людей, или отрицательное воздействие при попадании этих объектов или продуктов их жизнедеятельности в производственную или окружающую среду (ОСТ.59.01.003.51-85 «Система стандартов безопасности труда. Биологический фактор. Термины и определения»).

К «биологическому фактору» биотехнологических производств относятся:

- жизнеспособные клетки биологических объектов;
- инактивированные клетки;
- продукты метаболизма, выделяемые биообъектами в окружающую среду;
- продукты биологического синтеза, извлекаемые из биомассы.

Каждый из компонентов «биологического фактора» характеризуется определенной спецификой возможного воздействия на человека.

### **4.1. Живые и инактивированные клетки микроорганизмов**

#### **4.1.1. Понятие об инфекционном процессе**

Основная масса гетеротрофных микроорганизмов представлена *сапрофитами*, жизнедеятельность которых не зависит от других ор-



ганизмов. Они используют в качестве источника углерода разнообразные органические соединения. Глобальная экологическая роль этих микроорганизмов определяется участием в биогеохимических круговоротах веществ в природе: углерода, азота, серы и др. Они выполняют функцию редуцентов в трофической цепи.

Помимо сапрофитов, среди микроорганизмов выделяется разнообразная и широкая группа *паразитов*, зависящих в получении питательных веществ от других организмов. Среди паразитов выделяется группа *облигатных и факультативных паразитов*. Облигатные паразиты не способны жить вне клетки хозяина. Факультативные паразиты сохраняют способность к самостоятельному существованию в окружающей среде.

Выделяется также группа *патогенных микроорганизмов*, способных при попадании в макроорганизм вызывать патологические изменения (заболевания). Патогенные микроорганизмы утратили способность к образованию ряда ферментов, необходимых им при сапрофитном существовании, но приобрели способность синтезировать токсины и другие биополимеры, определяющие их патогенные свойства.

*Патогенность* – это видовая, генетически детерминированная (определяемая комплексом признаков, контролируемых рядом генов) потенциальная способность определенных видов микроорганизмов вызывать у чувствительного к ним макроорганизма (человека, животного, растения) заболевания при естественных для данного микроба условиях заражения.

Патогенность – более широкое понятие, чем паразитизм, а группа патогенных микроорганизмов более обширна, чем группа микробов-паразитов. Среди патогенных выделяются *условно патогенные* (оппортунистические виды) микроорганизмы, которые вызывают заболевания лишь при определенных состояниях макроорганизма, например, при ослаблении его иммунной системы.

Установлено, что многие бактерии, считавшиеся ранее сапрофитами, также могут проявлять патогенные свойства в отношении человека, т. е. от состояния мутуализма при определенных условиях могут переходить к паразитизму.

Патогенность микроорганизмов характеризуется выраженной степенью специфичности, т. е. способностью вызывать определенные патологические изменения, что связано с биологическими свойствами патогена, его локализацией, распространением в макроорганизме и поражением соответствующих органов и тканей.

В процессе эволюции между микроорганизмами и другими организмами (человеком, животными, растениями, насекомыми и др.)



сложились разнообразные и сложные взаимоотношения. В природных экосистемах сформировались ассоциации микроорганизмов, биоценозы, приспособленные к совместному существованию в определенных условиях окружающей среды. Совокупность микробных ценозов, сложившихся в открытых полостях организма человека, составляют так называемую *нормальную (естественную) микрофлору организма* (микрофлору кожи, ротовой полости, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы и др.), которая поддерживает его нормальные физиологические функции.

Нормальная микрофлора человека представлена облигатной (постоянной) микрофлорой, называемой *аутохтонной*, и факультативной (случайной) или *транзитной*. В состав нормальной микрофлоры входят как сапрофитные, так и условно-патогенные формы.

Микрофлора, присутствующая на коже и слизистых поверхностях открытых полостей организма, включает десятки и сотни разнообразных видов. Наиболее сложные микробоценозы у млекопитающих – это микрофлора рта, носоглотки и толстой кишки.

На поверхности кожи наиболее часто обнаруживаются непатогенные штаммы бактерий родов *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, дрожжи *Candida albicans* и др.

В ротовой полости, особенно в зубном налете, встречается более ста видов непатогенных микроорганизмов – это бактерии родов *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, простейшие, дрожжи *C. albicans* и др.

В состав микрофлоры дыхательных путей входят непатогенные бактерии родов *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* и др.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта, особенно толстой кишки, включает более 200 разных видов факультативно и облигатно анаэробных микроорганизмов, значительное большинство которых представлено бифидобактериями, молочнокислыми бактериями, *Escherichia coli* и др.

Микроорганизмы нормальной микрофлоры являются комменсалами по отношению к макроорганизму и антагонистами по отношению к патогенной микрофлоре. Особенно большое значение придается молочнокислым бактериям, которые обладают антагонистическими свойствами по отношению к гнилостным микробам, обитающим в кишечнике и образующим продукты, токсичные для макроорганизма, особенно при разложении белка. Важны также энтеробактерии (*Escherichia coli*), синтезирующие витамины и другие биологически активные вещества, необходимые макроорганизму.



Нарушение стабильности биоценозов нормальной микрофлоры человека определяется как *дисбиотический сдвиг*. При этом дисбаланс флоры является временным, и после прекращения действия фактора, вызвавшего изменения видового состава, восстанавливается. Если после прекращения действия фактора, обусловившего дисбаланс микрофлоры, ее состав не приходит к норме, а развившиеся изменения в микробном ценозе приводят к патологии, то такое состояние оценивается как *дисбактериоз (дисбиоз)*. Это может быть следствием длительной антибиотико- и лекарственной терапии, ослабления иммунитета организма и других причин. При дисбактериозе создаются условия для размножения условно-патогенных микробов, которые относятся к факультативной (транзитной) микрофлоре. При этом происходит увеличение численности гнилостных микроорганизмов из родов *Pseudomonas*, *Proteus*, дрожжей *Candida albicans*, резко возрастает число антибиотикорезистентных бактерий, нарушается витаминобразующая и ферментобразующая функция микрофлоры и ослабляется иммунологическая резистентность организма.

Дисбактериоз проявляется в виде увеличения численности популяций отдельных видов нормального ценоза и угнетения размножения других; появления среди нормальных представителей микрофлоры вариантов с признаками патогенности (например, *Escherichia coli* с гемолитическими свойствами); распространения отдельных видов ценоза в неестественном для них месте обитания (например, распространение *Escherichia coli* в мочевыводящих путях и, как следствие, развитие пиелонефрита).

Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы являются представителями разных классов и видов. Патогенез различных микроорганизмов определяется их физиолого-биохимическими особенностями. Патогенные свойства микроорганизмов характеризуются так называемыми факторами агрессии, определяющими их способность к инвазии (проникать в ткани макроорганизма, размножаться там и распространяться) и факторами патогенности, представляющими собой либо продукты метаболизма патогенов, либо их структурные компоненты.

Так, *патогенез простейших*, среди которых много паразитов беспозвоночных и позвоночных организмов животных и человека, определяется как фагоцитарным типом питания, так и другими взаимоотношениями с макроорганизмом, поскольку паразит в организме человека проходит либо весь жизненный цикл, либо только его часть (представители саркодовых, жгутиковых, споровиков). Болезни, вызываемые простейшими, называются *паразитарными*.



Простейшие, попадая в макроорганизм, способны поглощать клетки нормальной микрофлоры и приводить к дисбактериозу, изменению биоценозов отдельных органов; они могут поглощать отдельные тельца, например эритроциты, внедряться в ткани и разрушать их.

Например, дизентерийная амеба вызывает заболевание, называемое амебной дизентерией. Механизмы передачи инфекции осуществляются фекально-оральным путем. При попадании в тонкую кишку из цисты образуются вегетативные клетки паразита, которые начинают делиться и заселять толстую кишку. Затем они внедряются в слизистую оболочку под действием продуцируемых ими протеолитических ферментов и вызывают ее очаговые разрушения вплоть до образования некротических язв. Размножение амеб в организме происходит при иммунодефицитном состоянии организма, при дисбактериозе кишечника.

*Патогенез бактерий* (механизм развития инфекции), в основном, определяется их способностью синтезировать токсические вещества и гидролитические ферменты. Наибольшую роль играют эндо- и экзотоксины, образуемые бактериями.

*Эндотоксины* – это вещества, прочно связанные с микробной клеткой и поступающие в окружающую среду только после ее отмирания. Токсической функцией обладают пептидогликаны, липополисахариды и липопротеиды клеточной стенки грамотрицательных бактерий, тейхоевые кислоты грамположительных бактерий и др.

Эндотоксины являются термостабильными, устойчивыми к повышенной температуре, сравнительно слабыми антигенами. Они малоспецифичны и действуют на макроорганизм однотипно, вызывая повышенную температуру, интоксикацию, сосудистые нарушения.

Типичный пример – эндотоксины, образуемые бактериями кишечной группы.

Бактерии р. *Salmonella* являются возбудителями брюшного тифа и сальмонеллезов. Через ротовую полость и пищевод сальмонеллы попадают в тонкую кишку. Под действием выделяемых ими ферментов разрушается эпителий, сальмонеллы локализуются в слизистой оболочке, затем поступают в лимфу, в кровь. В результате лизиса клеток освобождается эндотоксин, который вызывает интоксикацию организма.

Бактерии р. *Shigella* – возбудители дизентерии. Патогенность определяется их адгезией на эпителиальных клетках толстой кишки. Токсигенность связана с образованием энтеротоксина, который действует на нервную и сосудистую системы.



Белковые кристаллы, образующиеся внутри клеток спорообразующих бактерий *Bacillus thuringiensis*, обладают энтомоцидными свойствами и применяются для борьбы с насекомыми-вредителями растений.

*Экзотоксины* – продукты, секретлируемые микробной клеткой во внешнюю среду. Некоторые экзотоксины могут вызывать заболевания – при том, что продуцент токсина не попадает в организм. Типичный пример – ботулин, продуцируемый *Clostridium botulinum*.

К продуцентам экзотоксинов относятся бактерии *Clostridium tetani* – возбудители столбняка, *Clostridium perfringens* – газовой гангрены, *Bacillus anthracis* – сибирской язвы и др.

Все известные экзотоксины в основном представляют собой высокомолекулярные белки, которые, как правило, обладают каталитическими свойствами, воздействуют на ферментные системы клетки. Экзотоксины термолабильны, обладают высокой токсичностью.

К группе токсинов относится также ряд низкомолекулярных пептидов (энтеротоксины), образуемых кишечной палочкой и некоторыми другими бактериями.

В последние годы выявлен новый класс токсинов, названных «модулинами». Модулины оказывают опосредованное воздействие на макроорганизм. Воздействуя на компоненты клеточной стенки бактерий (гликопротеиды, липопротеиды, белки), они индуцируют образование цитокинов – белков и гликопротеидов, оказывающих токсическое действие на эукариотические клетки. У ряда бактерий модулины являются единственным фактором патогенности, например, у бактерий кишечной группы – иерсиний.

Действие токсинов на макроорганизм зависит от избирательного поражения тех или иных тканей и органов. Например, энтеротоксины вызывают нарушение функции кишечника, нейротоксины нарушают функции нервной системы (изменяется зрение при ботулизме, наблюдаются судороги при столбняке и т. п.), токсины гемолизина лизируют кровяные тельца и др.

Патогенными для человека, вызывающими воспалительные процессы, являются возбудители стафилококковой инфекции – бактерии *Staphylococcus aureus* (Г+). Стафилококки образуют внеклеточные ферменты, а также имеют антигены, локализованные в клеточной стенке – тейхоевые кислоты и пептидогликаны. Основными факторами, определяющими их патогенность, являются энтеротоксины белковой природы и гемолизина. Развитие стафилококковой инфекции наиболее часто сопровождается поражением кожи и подкожного слоя.



Проявление патогенных свойств возбудителя определяется не только набором продуцируемых им токсинов, но и путем поступления их в организм. Так, например, токсин холерного вибриона (холероген), введенный парентерально, не может вызвать заболевания.

Семейство *Pseudomonadaceae* – включает большое количество сапрофитных видов, обитающих в почве, воде. Среди псевдомонад патогенны только три вида. Так, *P. aeruginosa* (синегнойная палочка) вызывает различные воспалительные процессы, образуя несколько токсинов, гемолизины, лейкоцидины.

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* (Г+) – крупная палочка с центральным расположением споры, факультативный анаэроб, образует эндо- и экзотоксины. Споры бациллы могут длительное время сохранять жизнеспособность в почве. Существенным фактором патогенности является капсула вокруг клетки, которая определяет способность бациллы фиксироваться на клетках макроорганизма. Заражение травоядных происходит через кожу, слизистые оболочки, желудочно-кишечный тракт, дыхательные пути. Заражение человека происходит от больных животных.

*Патогенез грибов* определяется рядом их физиологических свойств:

- способностью продуцировать в окружающую среду комплекс экзоферментов, способных осуществлять гидролиз природных биополимеров;
- способностью синтезировать токсины, афлатоксины и другие биологически активные вещества;
- особенностями их роста – прорастанием конечных клеток гиф, образованием мицелия; способностью образовывать споры, устойчивые к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Эти свойства грибов определяют их широкое распространение в природных и техногенных экосистемах.

Инфекционные заболевания, вызванные условно-патогенными грибами, называются *микозами*. Микозы служат показателями снижения иммунореактивности организма. Так, аспергиллез, пенициллез, кандидоз и другие рассматриваются как индикаторная патология при иммунодефицитах. Микозы, в зависимости от локализации поражения, подразделяются на четыре группы:

- *системные*, или глубокие микозы, при которых поражаются внутренние органы и вовлекаются в процесс различные ткани макроорганизма;
- *подкожные*, при которых поражаются кожа, подкожная клетчатка и кости;



- *эпидермомикозы* – в патологический процесс вовлекаются эпидермис, волосы и ногти;
- *поверхностные* – поражают лишь волосы и самый поверхностный роговой слой эпидермиса.

Возбудители глубоких и подкожных микозов встречаются в почве. Механизмы и пути передачи инфекционного агента при различных микозах различаются. Например, системные микозы развиваются после вдыхания спор возбудителя, подкожные – после попадания спор или фрагментов мицелия непосредственно в рану на коже.

При глубоких микозах первичные поражения затрагивают легкие и их клиническое течение сходно с туберкулезом с высокой летальностью. Возбудители могут распространяться с кровотоком по всему организму. При системных микозах, как правило, наблюдаются аллергические проявления. Эти заболевания – неконтагиозные (не передаются от человека к человеку или от животного к человеку).

Механизмы патогенного действия возбудителей глубоких микозов связаны с полисахаридами клеточной стенки спор, а также с действием продуцируемых протеолитических экзоферментов.

При глубоких микозах конидии попадают аэрогенным путем в легкие, развиваются в альвеолах, а затем распространяются по всему организму. Для лечения системных микозов широко используются полиеновые антибиотики (особенно амфотерицин В).

Грибы, вызывающие эпидермомикозы (дерматофиты), чаще обитают на коже млекопитающих и лишь единичные обнаруживаются в почве. Дерматофиты приближаются к категории паразитов человека и животных, передающихся при контакте. Они прорастают в роговом слое, вызывая разнообразные по клиническому проявлению и локализации заболевания.

Условно-патогенные виды грибов для человека и животных выявлены среди родов *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor*, *Penicillium* и др. Условно-патогенные грибы проявляют активность в ослабленных организмах людей, получающих антибиотики широкого спектра действия, кортикостероиды, лучевую терапию.

В настоящее время известно более 100 видов дрожжей рода *Candida*, большинство которых являются сапрофитами. Многие широко используются в биотехнологии для получения белково-витаминных кормовых добавок. Дрожжи *C. albicans* являются факультативными патогенами. Факультативные патогены выявлены среди *C. tropicalis* и *C. kruzei*. Они способны вызывать кандидозы. Наиболее распространен кандидоз ротовой полости, кандидозный вульвовагинит, бронхо-



легочный кандидоз. Как вторичная инфекция на фоне онкологических заболеваний, могут поражаться и складки кожи.

Плесневые грибы *Aspergillus fumigatus* способны проникать в травмированную роговицу, обожженные ткани, вызывая заболевания, главным образом, у лиц с иммунодефицитным статусом. Низшие грибы родов *Rhizopus* и *Mucor*, поступая аэрогенным путем в организм, могут прорасти в стенках кровеносных сосудов, вызывая тромбозы, например, в легких, желудочно-кишечном тракте.

Грибы также могут вызывать микотоксикозы в результате действия на человека и животных токсинов (вторичные метаболиты). Наиболее широко известны микотоксины, продуцируемые грибами *Aspergillus flavus*, называемые афлатоксинами.

Проникновение микроорганизмов в макроорганизм, последующее их размножение и болезнетворное действие называется *инфекцией*.

*Совокупность физиологических и патологических процессов, возникающих в макроорганизме в результате внедрения и размножения патогенных микроорганизмов, вызывающих нарушение его внутренней среды и физиологических функций, обеспечивающих гомеостаз и равновесие с окружающей средой, называется инфекционным процессом.*

Инфекционный процесс протекает на организменном уровне, а в самом организме – на органно-тканевом, клеточном и субклеточном уровнях.

Динамика инфекционного процесса в определенной степени может быть сравнима с динамикой размножения микроорганизмов в биореакторе.

Первая стадия инфекционного процесса определяется заражением, т. е. поступлением в соответствующие «ворота» инфекции возбудителя. Следует отметить, что для каждого вида возбудителя «ворота» инфекции специфичны. Так, заражение малярией возможно только при попадании возбудителя в кровяное русло.

Попав в организм, микроб адгезируется на поверхности клеток и адаптируется к новой среде обитания, при этом он какое-то время не размножается, и заболевание не проявляется – такая стадия называется *инкубационным периодом* и аналогична лаг-фазе кривой роста культуры в биореакторе. Затем начинается размножение возбудителя и проникновение его самого или продуктов его жизнедеятельности во внутреннюю среду макроорганизма.

Макроорганизм при этом реагирует стереотипными реакциями, и процесс переходит из инкубационного периода в предболезнь. Больной чувствует слабость, недомогание, потерю аппетита и т. д.,



независимо от того, заразился ли он гриппом или дизентерией. В следующий период – разгар болезни, появляются характерные для данного заболевания симптомы. В этом периоде возбудитель интенсивно размножается и максимально продуцирует специфичные для него факторы патогенности. Здесь можно провести аналогию с экспоненциальной фазой роста микроба в биореакторе. Однако такая аналогия условна, поскольку в случае инфекционного процесса на динамику роста микробной популяции начинают влиять факторы защиты макроорганизма, а при искусственном культивировании лимитирующими являются уменьшение питательного субстрата и накопление продуктов метаболизма. Достигнув максимального уровня клинических проявлений, болезнь переходит в стадию выздоровления, когда возбудитель элиминируется под действием факторов защиты организма – аналогично тому, как в биореакторе размножение микробной массы прекращается и наблюдается автолиз культуры. Инфекционный процесс может прерваться на разных стадиях его развития, в таком случае говорят об *абортированном* течении инфекции. В качестве примера можно привести вакцинацию вирусом полиомиелита, когда инфицирование авирулентным вариантом вируса сопровождается его размножением в «воротах» инфекции (энтероциты). Но далее процесс не распространяется, и последующего поражения нервных клеток не происходит.

Инфекция может протекать как острое заболевание (быстрое начало, бурное развитие и относительно быстрое выздоровление) или переходить в хроническое течение, когда ведущим в проявлении болезни становится не сам микроб, а те перестройки, которые он вызвал в иммунной системе. При этом возбудитель заболевания сохраняется в организме в минимальном количестве.

В зависимости от биологических свойств возбудителя возможны рецидивы инфекционного процесса. При этом размножившаяся в разгаре болезни генерация возбудителя формирует иммунитет и происходит его элиминация. Но инфицирующая популяция микробов может оказаться неоднородной, и та ее часть, которая отличалась по антигенной структуре от активно размножавшейся и затем подавленной, оказывается устойчивой к образовавшемуся иммунитету и может развиваться, но уже с измененной антигенной структурой. Именно она может вызвать рецидив заболевания.

Инфекционный процесс может завершиться или полным выведением возбудителя из организма, или носительством, когда возбудитель сохраняется в организме, но не вызывает клинических проявлений. При этом он может выделяться во внешнюю среду и быть источником инфекции.



В зависимости от распространения в макроорганизме возбудителя, инфекция может быть *очаговой* (фурункул) или *генерализованной* (сепсис). Инфекционный процесс, начавшись как очаговый (местный), может генерализоваться. При этом происходит распространение возбудителя в кровяное русло и его размножение. Такое состояние называют *сепсисом*.

Природой возбудителя определяется форма инфекции: бактериальная, грибковая, вирусная, протозойная. В зависимости от числа видов возбудителей, вызывающих инфекцию, различают: *моноинфекцию* – вызывается одним возбудителем и *смешанную* инфекцию – вызывается двумя или несколькими видами.

В том случае, если возбудитель попал в организм извне, то это *экзогенная* инфекция; если возбудитель присутствовал в организме и вызвал патологический процесс, то это *эндогенная* инфекция (например, кандидоз, развившийся на фоне антибиотикотерапии).

В ряде случаев после перенесенного заболевания иммунитет не формируется и человек повторно заражается тем же возбудителем – такой вариант считается *реинфекцией* (гонорея).

Если возбудитель сохраняется в организме и вновь его инфицирует, и при каждом новом заражении увеличивается численность популяции – такое состояние принято считать *суперинфекцией*.

По характеру проявления различают:

- *латентную* (скрытую) инфекцию – возбудитель проникает в организм, размножается, но в макроорганизме формируется приобретенный иммунитет и возбудитель удаляется из организма. Латентная инфекция может характеризоваться длительным, иногда пожизненным пребыванием возбудителя в макроорганизме, а симптомы заболевания могут проявляться при снижении резистентности организма (герпес);
- *медленную* инфекцию – возбудитель проникает в организм и долгое время (месяцы, годы) может сохраняться в нем в латентном состоянии (инкубационный период), но при благоприятных для возбудителя условиях он начинает быстро размножаться, тяжесть заболевания прогрессирует, иммунный ответ макроорганизма крайне слабый. Как правило, это заканчивается тяжелым исходом.

В отдельную группу выделяют вирусные инфекции, при которых возбудитель длительное время может оставаться в неактивной форме, не проявляя себя, но при определенных условиях переходить в продуктивную фазу (онковирусы, ВИЧ).



В зависимости от инфекционного начала выделяют:

- *бактериемии* – наличие циркулирующих в крови организма бактерий;
- *вирусемии* – наличие циркулирующих в крови организма вирусов;
- *токсиемия* – в крови макроорганизма циркулируют бактериальные эндотоксины. Наблюдаются при заболеваниях, вызванных грамотрицательными бактериями (например, при сальмонеллезах, менингококковых и других инфекциях);
- *токсинемии* – в кровеносной системе циркулирует бактериальный экзотоксин (возбудитель в крови отсутствует), который проникает в клетки-мишени. Например, при таких заболеваниях, как ботулизм, дифтерия, столбняк и др.

Процесс возникновения и распространения среди населения специфических инфекционных состояний называется *эпидемическим процессом*. Он обусловлен взаимодействием трех элементов:

1. источника инфекции;
2. механизмов, путей и факторов передачи;
3. восприимчивости коллектива.

Источник инфекции – это живой или абиотический объект заражения людей или животных, являющийся естественной средой обитания патогенного микроба.

В зависимости от источника различают инфекции: антропонозные, зоонозные и сапронозные. При *антропонозных* инфекциях передача возбудителя происходит от человека к человеку. При *зоонозных* – от животного человеку, а при *сапронозных* – от абиогенных объектов (почва, вода) человеку.

При зоонозных и сапронозных инфекциях человек для возбудителя является биологическим тупиком, и передача его от человека к человеку не происходит. Постоянная циркуляция возбудителя и сохранение его как вида определяется очагом инфекции, т. е. теми популяциями, в пределах которых возможно распространение инфекции. Таким образом, резервуаром для антропонозов является человеческая популяция, для зоонозов – определенные виды восприимчивых животных, для сапронозов – почва, вода. Территория, на которой происходит циркуляция возбудителя, считается очагом инфекции. Если поддержание очага связано с популяцией диких животных, то такой очаг называется *природным*, в том же случае, если очаг сформировался в результате деятельности человека, например, за счет сельскохозяйственных животных, то такой очаг называется *антропоурическим*.



Механизмы передачи инфекционного агента могут быть разными. Выделяют фекально-оральный, контактный, воздушно-капельный, пылевой, трансфузионный или путь контакта кровеносных русел, половой, вертикальный – через плаценту от матери плоду, трансмиссивный – передача через живые инфицированные переносчики. Так, кишечные инфекции передаются фекально-оральным путем, а факторами передачи могут быть вода, молоко, мухи и т. д. В последнем случае мухи механически переносят возбудителя, и такой способ передачи нельзя считать трансмиссивным, когда возбудитель размножается в переносчике или проходит часть жизненного цикла, достигая инвазионной стадии (малярия).

Если патогенность – это способность микроорганизма в определенных условиях размножаться в макроорганизме и вызывать инфекционное заболевание, то степень патогенности штамма при определенном способе заражения макроорганизма (человека, животного, растения), называется *вирулентностью*. Вирулентность связана с биологическими свойствами микроорганизма и определяется рядом факторов:

- способностью микроорганизмов распространяться в организме-хозяине; размножаться на поверхности органов и тканей (колониализация);
- прикрепляться к клеткам-мишеням организма хозяина (адгезия);
- проникать в клетки (пенетрация) или в ткани (инвазия) и противостоять факторам неспецифической и иммунной защиты организма.

К факторам распространения относится ряд ферментов – в первую очередь протеазы, гиалуронидаза, стрептокиназа и др. Адгезивность патогена обусловлена поверхностными структурами микробной клетки (капсулы, жгутики, пили, белки-антигены клеточной стенки) и рецепторами клетки хозяина. Инвазивность микроба связана с его способностью синтезировать ферменты, нарушающие проницаемость клеток хозяина (фибринолизин, гиалуронидаза, плазмокоагулаза и др.).

Минимальное количество микробных клеток, способных вызывать инфекционный процесс, называется *инфицирующей дозой*. Инфицирующая доза зависит от видовой принадлежности возбудителя, его вирулентности и состояния макроорганизма (неспецифической и иммунной защиты).

Развитие заболевания, его тяжесть определяются степенью патогенности (вирулентностью) микроорганизма, что является индивидуальным свойством микроба. Вирулентность выражается в условно принятых единицах:



**LDM** – минимальная летальная доза, т. е. наименьшее количество микробных клеток, которое при определенном способе заражения вызывает 95%-ную гибель восприимчивых экспериментальных животных определенного вида, веса и возраста в течение заданного времени;

**LD<sub>50</sub>** – количество живых микробных клеток, вызывающих при определенном способе заражения гибель 50% восприимчивых животных определенного вида, веса и возраста в течение заданного времени.

#### 4.1.2. Понятие иммунитета

Организм человека реагирует определенным образом на внедрение других организмов и веществ, что является следствием его способности отличать чужеродные субстанции от собственных.

Целостная система биологических механизмов самозащиты организма, контролирующая гомеостаз, специфически распознающая любых генетически чужеродных для него агентов и уничтожающая их, называется *иммунитетом*.

Механизмы, ответственные за формирование иммунитета, подразделяются на *неспецифические* и *специфические*. Кроме того, различают две неразрывно связанные между собой формы иммунитета: *клеточный* иммунитет и *гуморальный* иммунитет. Гуморальный (от лат. *humor* – жидкость) иммунитет осуществляется через жидкие среды (лимфу, кровь).

Наиболее ранние защитные реакции организма носят неспецифический характер. К факторам неспецифической резистентности относятся клеточные и общефизиологические.

Клеточные (тканевые) факторы представлены барьерной функцией кожи и слизистых оболочек, пищеварительными ферментами, нормальной микрофлорой, фагоцитозом (узнавание и активное поглощение специализированными клетками крови чужеродных субстанций и их переваривание). Фагоцитоз играет большую роль в защите организма от инфекционных агентов. У простейших организмов фагоцитарный процесс выполняет две функции – защитную и пищеварительную. У высших организмов, в том числе и у человека, фагоцитоз относится к факторам неспецифической защиты организма от чужеродных агентов.

К общефизиологическим факторам относятся выделительная система, перистальтика кишечника, реснитчатый эпителий, кашель, чихание, повышенная температура тела.



К гуморальным факторам неспецифического иммунитета относится *комплемент*. Под комплементом понимают термолабильную систему белковых и гликопротеиновых факторов нормальной сыворотки крови, способных активировать друг друга по каскадному типу. Последний из факторов системы комплемента – С9 – является мембраноатакующим, т. е. связываясь с цитоплазматической мембраной клетки, он нарушает ее целостность. Активация комплемента может происходить двумя путями: классическим и альтернативным. В случае классического пути С2 компонент комплемента активируется иммунным комплексом (антиген-антитело), а затем активируются С1, С3 и С4 компоненты комплемента. В случае альтернативного пути сразу активируется компонент С3. Эта активация не зависит от образования иммунных комплексов и может осуществляться различными инициаторами (например, липополисахаридами грамотрицательных бактерий). Фракции комплемента находятся в крови в неактивном состоянии, но могут активироваться при попадании бактерий в кровь. Функциями комплемента являются: 1) лизис бактериальных клеток под действием фермента лизоцима, разрушающего клеточную стенку бактерий; 2) подготовка бактерий к поглощению макрофагами, т. е. факторы сыворотки крови взаимодействуют с поверхностью чужеродных частиц (*опсонизация* – усиление фагоцитоза). В этих процессах участвует система белков нормальной сыворотки крови, способная активировать комплемент при соединении с липополисахаридами клеточной стенки бактерий; интерферон – белок, активирующий синтез ферментов и ингибиторов, блокирующих трансляцию вирусных мРНК и другие бактерицидные вещества клеток крови.

*Специфический иммунитет* определяется состоянием иммунной системы организма, развитием специфических иммунологических реакций.

Вещества, несущие признаки генетической чужеродности называются *антигенами*. При попадании в организм они вызывают развитие специфических иммунологических реакций. Антигенами могут быть бактерии, растительные и животные клетки, их структурные компоненты (белки, высокомолекулярные полисахариды, гликопротеиды, пептидогликаны и др.), а также неклеточные, чужеродные для данного организма вещества: токсины, сыворотка крови и т. п. По способности вызывать иммунный ответ антигены подразделяют на *сильные* и *слабые*. Наиболее сильными антигенами являются белки.

Антигенность – способность антигена распознаваться иммунной системой и взаимодействовать с эффекторной ее частью (антителами, клетками-эффекторами).



Иммуногенность – способность антигена индуцировать иммунный ответ.

В некоторых случаях антиген не обладает иммуногенностью, но сохраняет антигенность. Такой антиген является неполноценным и называется *гаптеном*. Иммунный ответ наблюдается при конъюгировании гаптена с полноценным антигеном. В качестве гаптена могут выступать простые соединения, такие, например, как ионы металлов и др.

Иммуногенность антигена зависит от его молекулярной массы, особенности структуры и конформации молекулы. Так, высокомолекулярные формы полисахаридов являются иммуногенами, в то время как высокомолекулярный белок желатин не вызывает иммунного ответа.

Степень специфичности взаимодействия антигена и антител определяется не всей его молекулой, а только незначительной его частью (антигенной детерминантой), при этом иммунная система способна дифференцировать различия в структуре этой детерминанты и даже ее положения в молекуле антигена. В связи с этим высокая специфичность распознавания иммунной системой антигенов, вызвавших ее активацию, может быть использована для дифференцирования видоспецифических, групповых и типовых микробных антигенов. Это дает возможность определять не только микроорганизм, используемый в биотехнологическом производстве, но и отличить его от других штаммов нетехногенного происхождения.

У людей и животных иммунная система представлена лимфоидной тканью. Центральной клеткой иммунной системы является лимфоцит, который распознает антиген и реагирует на его присутствие специфическим ответом, который обеспечивается иммунокомпетентными клетками, Т- и В-лимфоцитами и макрофагами, предшественниками которых служат стволовые клетки костного мозга. На поверхности Т- и В-лимфоцитов находятся специфические рецепторы. У В-лимфоцитов такими рецепторами являются белки-иммуноглобулины.

В-лимфоцит – это предшественник антителообразующих клеток, он отвечает за гуморальный иммунный ответ.

Взаимодействуя с бактериями, попавшими в макроорганизм, антитела их *агглютинируют* (склеивают), что облегчает их поглощение фагоцитами.

Имеется особый класс антител, функцией которых является нейтрализация токсинов.

Т-лимфоциты осуществляют клеточный иммунный ответ. Популяция Т-лимфоцитов реагирует с антигеном и приобретает свой-



ство цитотоксичности, т. е. приводит к гибели клетки, а вместе с ней и патогена. Т-лимфоциты при встрече с антигеном (например, с клеткой патогенных микробов) стимулируют особый класс фагоцитов-макрофагов, которые поглощают и переваривают посторонние «чужие» вещества.

В целом кооперация Т- и В-лимфоцитов при участии макрофагов – один из важнейших механизмов регуляции иммунного ответа организма.

При попадании микроба в организм происходит его фагоцитоз, результатом которого является деградация его антигенов. Отдельные антигенные детерминанты встраиваются в цитоплазматическую мембрану фагоцита и в таком виде взаимодействуют с лимфоцитом. В-лимфоциты имеют на своей поверхности рецепторы, способные связываться с антигенной детерминантой. Популяция лимфоцитов неоднородна по специфичности к различным детерминантам. Поэтому только определенные лимфоциты, имеющие рецепторы к соответствующей антигенной детерминанте, могут взаимодействовать с макрофагом. После взаимодействия в лимфоците в результате митоза формируется клон В-лимфоцитов, имеющих на своей поверхности те же рецепторы, что и исходная клетка. Затем такие лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, продуцирующие антитела. Так происходит ответ на определенные виды антигенов, которые называют Т-независимыми.

Возможно и другое развитие событий. После взаимодействия макрофага с антигеном В-лимфоцит может делиться только под действием митогена, который синтезируется Т-лимфоцитом. В результате формируется клон В-лимфоцитов с определенными видами рецепторов. Часть клона превращается в плазматические клетки, а часть остается в виде клеток памяти. При первом контакте с антигеном иммунный ответ характеризуется невысокой продукцией антител, но в результате накопления клеток памяти повторная иммунизация оказывается более эффективной.

Специфические особенности иммунитета:

- иммунологическая память;
- иммунологическая толерантность.

Если иммунизация идет до созревания иммунной системы в эмбриональном периоде, то клоны лимфоцитов с комплементарными рецепторами становятся запрещенными, и в дальнейшем при контакте с таким антигеном оказываются инертными. Именно по этой причине иммунная система не реагирует на антигены собственного организма.



Различают две фазы иммунного ответа: *индуктивную* и *продуктивную*. Индуктивная фаза протекает с момента попадания антигена в организм до появления антителообразующих клеток. Происходит распознавание антигена иммунокомпетентными клетками, кооперация между Т- и В-лимфоцитами.

Антигенная специфичность, проявляющаяся в реакциях антиген – антитело, является уникальным биологическим явлением.

В продуктивной фазе происходит пролиферация клеток лимфоидных органов (селезенки, лимфатических узлов и лимфоидных скоплений на слизистых оболочках), синтез и секреция антител.

Первичный иммунный ответ наблюдается при первичном попадании антигена в организм. Часть лимфоцитов после взаимодействия с антигеном *сенсibiliзуются* (накапливаются специфические антитела), за счет чего повышается чувствительность организма к антигену. В течение длительного времени сенсibiliзированные клетки могут сохраняться в лимфоидной ткани, сохраняя память о специфичности контактировавшего с ними антигена.

Вторичный иммунный ответ проявляется после повторного введения того же антигена. При этом количество образующихся антител значительно больше, чем при первичном ответе.

Иммунитет как совокупность защитных реакций организма, контролирующих его гомеостаз, может быть *врожденным* (наследственным) и *приобретенным*. Врожденный иммунитет характеризуется специфической невосприимчивостью, обусловленной врожденными биологическими особенностями макроорганизма. Генотип индивида (группы или расы) определяет видовую невосприимчивость к определенным инфекционным заболеваниям. Видовой иммунитет может быть абсолютным (100%-ная невосприимчивость к данному фактору, связанная с генетически обусловленными особенностями метаболизма хозяина) и относительным (менее стабильным, зависящим от внешних условий).

Приобретенный иммунитет формируется в результате индивидуального развития и характеризуется строгой специфичностью. Он может быть *естественно* и *искусственно* приобретенным. После перенесенного инфекционного заболевания развивается естественно приобретенный иммунитет. Искусственно приобретенный иммунитет, в свою очередь, может быть *активным*, сформированным в результате введения в организм вакцинных препаратов, содержащих антигены, и *пассивным*, образующимся после введения в организм иммунных сывороток, содержащих готовые антитела.



Различают также иммунитет *антимикробный*, в котором принимают участие антитела, направленные на уничтожение микробов; *стерильный* – обеспечивающий полную элиминацию возбудителя из организма; *нестерильный* – сохраняется только при наличии возбудителей в организме (например, туберкулез); *антитоксический* – направлен на нейтрализацию микробных токсинов с участием антител.

Однако у макроорганизмов может наблюдаться иммунопатология, врожденные или приобретенные дефекты иммунной системы, т. е. неспособность осуществлять клеточные и гуморальные защитные реакции. Дефектность иммунной системы проявляется в виде аллергических реакций. Если антиген попадает в организм, который имеет наследственную склонность к избыточному иммунному ответу (гиперчувствительность), то такой антиген называют *аллергеном*, а патологический иммунологический процесс – *аллергией*.

После иммунизации в ряде случаев развивается повышенная чувствительность к повторному введению антигена. Эти состояния принято называть *гиперэргическими*.

Выделяют 4 типа таких состояний, три из них – антителзависимые (1, 2, 3 типы), один (4 тип) – клеточнозависимый. Антителзависимые реакции развиваются сразу же после введения антигена, поэтому их обозначают как *гиперчувствительность немедленного типа* (ГНТ). Клеточнозависимая реакция развивается медленно и называется *гиперчувствительностью замедленного типа* (ГЗТ).

Суть ГНТ I типа состоит в том, что при иммунизации индуцируется продукция антител, способных фиксироваться на тучных клетках, содержащих гистамин, серотонин и другие физиологически активные вещества. При взаимодействии фиксированных на поверхности тучных клеток антител происходит выброс гистамина, который вызывает спазм гладкой мускулатуры, увеличивает проницаемость сосудов, снижает артериальное давление. Клинически такая картина оценивается как *анафилаксия*.

II тип связан с тем, что антиген, вызвавший сенсibilизацию, фиксируется на клетках макроорганизма, образуя комплекс антиген-антитело. Этот комплекс активирует систему комплемента, и клетка, на которой образовался комплекс антиген-антитело, лизируется, т. е. наблюдается реакция иммунного лизиса.

III тип характеризуется образованием комплекса с циркулирующими в крови антигеном и антителами. Такой комплекс сорбируется на цитоплазматических мембранах и активирует комплемент, что также приводит к лизису.



IV тип (ГЗТ) можно наблюдать через 48 часов после введения антигена при условии предварительной сенсибилизации организма. Если антиген представлен чужеродными клетками, Т-лимфоциты при прямом контакте лизируют их, при этом в результате хемотаксиса происходит миграция макрофагов в зону воспаления.

Для выявления состояния гиперчувствительности используют аллергические тесты, заключающиеся в том, что внутрикожно вводят малые дозы антигена (аллергена); в случае наличия аллергии на месте введения развивается реакция на тот антиген, который вызвал сенсибилизацию. Гиперчувствительность немедленного типа проявляется уже через 1–24 часа, гиперчувствительность замедленного типа – через 48 часов.

Среди микроорганизмов различают несколько групп антигенов: Н-антигены (жгутиковые) – белок флагелин; О-антигены (соматические) – комплексы липополисахаридов, липопротеидов, связанных с клеточной стенкой бактерий; К-антигены (капсульные) – липополисахаридной природы; Vi-антигены (капсульные высоковирулентных штаммов бактерий).

Среди антигенов выделяют: *аутоантигены* – вещества, входящие в состав органов и тканей, которые при определенных условиях распознаются как чужеродные и вызывают иммунный ответ. *Гетероантигены*, или перекрестно реагирующие, имеют общие антигенные детерминанты у представителей разных видов микроорганизмов, растений и животных. Общие гетероантигены человека и паразитирующих бактерий позволяют последним осуществлять так называемую антигенную мимикрию.

Иммунопрофилактика – способ предупреждения инфекционных заболеваний путем создания искусственного специфического иммунитета.

На основе компонентов, составляющих вакцины, различают:

- *живые вакцины* – препараты, состоящие из суспензии живых наследственно измененных ослабленных клеток возбудителей инфекционных заболеваний, или высушенных в специальных физиологических средах;
- *убитые вакцины* – препараты, состоящие из убитых клеток возбудителей инфекционного заболевания, обладающих иммуногенными свойствами;
- *химические вакцины* – препараты, состоящие из отдельных антигенов;
- *анатоксины* – препараты, представляющие собой токсины, утратившие в процессе специальной обработки токсические свойства, но сохранившие иммуногенность.



Генно-инженерные вакцины получают при использовании продуцентов, полученных генно-инженерными методами, способных продуцировать чужеродные антигены с выраженными иммунопротекторными свойствами.

Клетками макроорганизмов синтезируются ДНК-вакцины – плазмидные векторы, кодирующие иммуногенные антигены, т. е. антигены микроорганизмов или вирусов, индуцирующие иммунный ответ.

Вакцины могут быть в виде монопрепаратов, предназначенных для профилактики специфических инфекций, а также в ассоциированной форме для создания иммунитета против нескольких инфекций.

В последние годы в мире наблюдается общее снижение резистентности макроорганизмов, т. е. снижение иммунитета и невосприимчивости к инфекционным болезням. При этом возрастает значение условно-патогенной микрофлоры в развитии заболеваемости.

Развитию заболеваний, вызываемых условно-патогенной микрофлорой, способствуют какие-либо местные или общие нарушения защитных сил макроорганизма, открывающие доступ в его ткани и органы микробам, безопасным в обычных условиях. Условно-патогенные микроорганизмы, многие из которых являются сапрофитами, могут реализовать свой патогенный генотип в макроорганизмах с измененным иммунологическим статусом или при снижении его общей резистентности.

#### **4.1.3. Генноинженерные штаммы**

Широкому использованию генномодифицированных микроорганизмов (ГММ) в настоящее время препятствует ряд нерешенных научных проблем и возникающих опасений. В частности, представляется опасной возможность интродуцирования в окружающую среду ГММ, которые не прошли длительной коэволюции в природных экосистемах и которые, неограниченно размножаясь, могут привести к вытеснению аборигенных микроорганизмов, что в свою очередь, приведет к нарушению экологического равновесия, снижению биоразнообразия, к бесконтрольному переносу чужеродных генов в природные организмы, к возможному образованию неизвестных ранее патогенов растений и животных. Высказывается предположение о возможности под действием внедрения в ДНК чужеродного гена активизации и других генов, кодирующих опасные свойства организма.

Проблема оценки таких предполагаемых негативных последствий применения ГММ в настоящее время осложнена тем, что отсутствуют какие-либо научные исследования, демонстрирующие отрицательные последствия практического использования ГММ.



Предполагаемые возможные негативные воздействия ГММ определяют необходимость всесторонних исследований безопасности пищевых и кормовых продуктов, при производстве которых использовались генетически модифицированные микроорганизмы, растения или животные.

Экспертами Европейской биотехнологической федерации и Евросоюза (ЕС) разработан стандарт описания ГММ, необходимый для всесторонней оценки их безопасности. Стандарт включает описание организмов донора и реципиента, степень сходства между ними, данные о генетическом материале, поступившем в клетку реципиента, стандартную микробиологическую характеристику штамма, таксономию, методы идентификации ГММ, методы мониторинга за численностью данного ГММ, факторы, ограничивающие воспроизведение, рост и выживаемость штамма, его патогенные и физиологические свойства, стабильность этих свойств и др.

В связи с недостаточной изученностью степени опасности микроорганизмов, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК, а также ввиду отсутствия специфических методических подходов к гигиеническому нормированию таких штаммов, выброс данных микроорганизмов в процессе производства в воздух рабочей зоны и в окружающую среду запрещен.

#### **4.2. Продукты микробиологического синтеза как «биологический фактор»**

Продукты микробиологического синтеза могут быть подразделены на две группы.

*Первая группа* – продукты синтеза, экзометаболиты, выделяемые в окружающую среду (растворимые или газообразные соединения). К экзометаболитам относятся соединения, являющиеся как целевыми продуктами биотехнологического процесса (такие как антибиотики, ферменты, органические кислоты, некоторые витамины и др.), так и соединения, которые не являются целевыми, а представляют собой промежуточные продукты метаболизма (например, продукты кислот и нейтральной природы при окислении углеводов) или промежуточные продукты синтеза (например, такие как амидфенилуксусная кислота – предшественник синтеза пенициллина).

Они находятся в рециркулирующих или в отработанных водных потоках производства, а также в виде аэрозоля попадают в воздух с газоздушными выбросами.



*Вторая группа* – это целевые продукты микробиологического синтеза, накапливаемые в клетке. К таким продуктам относятся гормоны, экстрагируемые из тканей млекопитающих, рекомбинантные белки, образуемые культивируемыми клетками животных, нуклеиновые компоненты, некоторые ферменты и коферменты микробной клетки, токсины и другие биологически активные вещества. Эти продукты выделяются из клетки методами химической технологии (водной экстракцией, экстракцией органическими растворителями, ионообменными, хроматографическими и другими методами). В незначительных концентрациях они могут содержаться в жидкостных производственных потоках и в виде аэрозоля – в газовоздушных выбросах.

Влияние продуктов микробиологического синтеза и их воздействие на работающий персонал и окружающую среду зависит от объемов производства, совершенства технологического процесса и природы метаболитов.

Наибольшие объемы производства и биологическая активность характерна для антибиотиков и ферментов.

*Антибиотики* – вещества природного происхождения или их полусинтетические производные, экзометаболиты. Биологическая активность их характеризуется антимикробными свойствами. Антибактериальное действие антибиотиков может быть *бактерицидным*, т. е. вызывающим гибель бактерий, и *бактериостатическим* – задерживающим рост и развитие бактерий. Аналогичными типами действия обладают противогрибковые антибиотики: *фунгицидным* и *фунгистатическим*.

Способность к биосинтезу антибиотиков является специфической особенностью вида или даже штамма микроорганизмов, одним из их приспособительных свойств.

Антибиотики классифицируют по химической структуре, молекулярному механизму действия, по спектру действия и по биологическому происхождению.

По химическому составу различают следующие группы антибиотиков: 1) азотсодержащие гетероциклические соединения, имеющие  $\beta$ -лактамное кольцо – пенициллин, цефалоспорин; 2) ароматические соединения, производные бензола – левомицетин; 3) тетрациклины, содержащие шестичленные циклы – тетрациклин и его производные; 4) аминогликозиды, в составе которых имеются аминосахара – стрептомицин; 5) макролиды, содержащие макроциклическое лактонное кольцо, связанное с аминосахарами – эритромицин, олеандомицин; 6) полипептиды – полимиксин, бацитрацин;



7) ациклические соединения, содержащие несколько сопряженных двойных связей – нистатин, леворин.

Действие антибиотиков на микроорганизмы связано с их способностью подавлять те или иные биохимические реакции, происходящие в микробной клетке. В зависимости от механизма действия различают 6 групп антибиотиков.

1. *Нарушающие синтез клеточной стенки.* К этой группе относятся, например,  $\beta$ -лактамы. Пенициллин препятствует образованию ацетилмурамовой кислоты, входящей в состав клеточной стенки бактерий. Нарушение синтеза клеточной стенки вызывает лизис протопласта и гибель клетки.

2. *Нарушающие молекулярную организацию и синтез клеточных мембран.* Примерами таких препаратов являются полиеновые и некоторые полипептидные антибиотики, например полимиксин.

3. *Нарушающие синтез белка.* Это наиболее многочисленная группа препаратов. Представителями этой группы являются аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, левомицетин, нарушающие синтез белка на разных уровнях.

4. *Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот.* К данной группе относятся в основном противоопухолевые антибиотики, например, актиномицины, подавляющие синтез РНК; рубомици, подавляющий синтез ДНК.

5. *Подавляющие активность различных ферментных систем:* дыхательной цепи, оксидаз и дегидрогеназ, ферментов, участвующих в синтезе полисахаридов. Это – олигомицин, колицин.

6. *Обладающие конкурентным действием в процессе метаболизма.* Действие антибиотиков сводится к тому, что они, вторгаясь в процессы обмена веществ, нарушают их нормальное течение и тем самым приводят к подавлению развития микроорганизма или к его гибели.

Вторжение в клеточный метаболизм может осуществляться различными путями. Если антибиотик имеет строение, сходное со строением какого-либо метаболита, то он вовлекается вместо него в клеточный обмен, но поскольку выполнить функцию этого метаболита он не может, то обмен веществ нарушается, и микроорганизм не развивается. Антибиотик может выступать как конкурент метаболита, т. е. в роли антиметаболита. Например, сульфониламид – белый стрептоцид – препятствует использованию клеткой *p*-аминобензойной кислоты, которая участвует в биосинтезе фолиевой кислоты, необходимой для жизнедеятельности клетки.

По спектру действия антибиотики подразделяют на две группы – узкого и широкого спектра действия. К антибиотикам узкого спектра



действия относят пенициллины, оказывающие губительное действие только на Г+ бактерии, Г- кокки и спирохеты. Они не активны в отношении кислотоустойчивых и Г- бактерий, микоплазм, риккетсий, простейших. В эту же группу входят полиеновые антибиотики, действующие на дрожжи и некоторых простейших (амебы, лейшмании, трихомонады), макролиды, действующие на Г+ и Г- кокки.

К антибиотикам широкого спектра действия относятся аминогликозиды, подавляющие рост кислотоустойчивых, многих Г+ и Г- бактерий. Некоторые из них действуют и на простейших; тетрациклины – на многие Г+ и Г- бактерии, риккетсии, хламидии и микоплазмы; левомицетин – на Г+, а также на некоторые Г- бактерии, риккетсии, хламидии.

Выделяют группы противотуберкулезных антибиотиков (стрептомицин, канамицин и др.); противогрибковых антибиотиков (нистатин, гризеофульвин и др.); противоопухолевых антибиотиков, обладающих цитотоксическим действием (актиномицин С, митомицин С, оливомицин и др.); противоамебные – фумагиллин.

По происхождению различают 3 группы антибиотиков:

1. образуемые грибами – пенициллин, цефалоспорин и др.;
2. образуемые бактериями – грамицидин, полимиксин и др.;
3. продуцируемые актиномицетами – левомицетин, тетрациклин, нистатин и др.

Широкое, эффективное использование антибиотиков для борьбы с возбудителями заболеваний человека и животных выявило важную проблему их применения – возникновение устойчивых форм патогенных микроорганизмов по отношению к антибиотикам (особенно при применении пенициллина и стрептомицина), т. е. возникновение лекарственной резистентности микроорганизмов. Чем больше патогены контактируют с антибиотиками, тем больше возникает антибиотикорезистентных форм бактерий. Появление таких форм бактерий *in vivo* приводит к снижению эффективности лечебных свойств препаратов антибиотиков.

Генетические и биохимические механизмы резистентности бактерий к антибиотикам могут быть разными. Может быть природная резистентность к лекарственным средствам, механизм которой зависит от видовых особенностей бактерий, например, отсутствие у бактерий «мишени» для воздействия антибиотика. Так, устойчивость энтеробактерий к пенициллину связана с наличием у них β-лактамаз, находящихся под хромосомным контролем; анаэробы лишены наружных энергозависимых транспортных систем и т. п.



Резистентность может быть приобретенной, что является либо результатом мутации в хромосомных генах, контролирующих синтез компонентов клетки (клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, рибосом, транспортных белков и др.), служащих «мишенью» для антибиотика, либо результатом переноса хромосомных или плазмидных генов антибиотикоустойчивости, детерминирующих синтез ферментов, инактивирующих и модифицирующих антибиотика.

Устойчивость бактерий к антибиотикам может определяться внехромосомной резистентностью, т. е. наличием плазмид, передаваемых из клетки в клетку при конъюгации.

Комплекс генов, определяющих устойчивость бактерий одновременно к нескольким антибиотикам, называется фактором резистентности (R-фактор).

Наряду с наличием плазмид устойчивость бактерий к антибиотикам может быть связана с транспозонами – мигрирующими элементами, содержащими дополнительные гены, обуславливающие резистентность к антибиотикам, а также к бактериофагам.

Возникновение устойчивых к антибиотикам форм бактерий определяет необходимость соблюдения правил применения антибиотиков, направленных на сдерживание процессов образования устойчивых к ним форм микроорганизмов – это сокращение использования антибиотиков в качестве профилактических средств; исключение практики применения в течение многих лет одних и тех же антибиотиков; повышение лечебных доз антибиотика; введение антибиотиков непосредственно в очаги поражения организма; применение сочетанных препаратов – антибиотиков и других биологически активных соединений, снижающих появление устойчивых форм (ингибиторы  $\beta$ -лактамаз), повышающих чувствительность бактерий (основные белки) и др.; применение, так называемых, бис-антибиотиков, препаратов, получаемых на основе двух антибиотиков, связанных в ковалентный комплекс.

Антибиотики могут оказывать и побочное действие на организм. Наиболее частым побочным действием являются аллергические реакции, наиболее характерные для пенициллиновой группы. Для многих групп антибиотиков характерны токсические реакции (нервно-мышечная блокада, неврологическая и нефрологическая токсичность и др.).

*Ферментные препараты* являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения. В биотехнологических производствах не только производятся ферментные препараты, но и широко используются. Ферментные препараты так-



же применяются в пищевой и легкой промышленности, в кормопроизводстве, при получении синтетических моющих средств, косметических препаратов, лекарственных и профилактических средств, в аналитических целях и др.

Промышленностью выпускается около 250 наименований ферментных препаратов. Основными из них по объемам производства являются:

- грибные и бактериальные протеиназы;
- глюкоамилазы;
- грибные и бактериальные  $\alpha$ -амилазы;
- глюкоизомераза;
- пектолитические, целлюлолитические и гемицеллюлитические ферменты;
- $\beta$ -галактозидаза;
- липазы и др.

Ферментные препараты как белковые вещества могут оказывать аллергическое влияние на человека, а также при попадании на кожу и слизистые оболочки вызывать их поражение и контактный аллергический дерматит.

В промышленных производствах ферментные препараты как «биологический фактор» могут присутствовать в жидкостных технологических потоках, в виде аэрозоля в газовоздушных выбросах, а также в твердых производственных отходах (особенно при поверхностном способе их производства).

При поверхностных способах культивирования продуцентов особую опасность для персонала представляет воздух заводских помещений, загрязненный органической пылью, представленной компонентами питательной среды (частицами отрубей, опилок и т. п.), полупродуктами производства (культурой продуцента), мельчайшими частицами порошкообразных препаратов и др.

*Витамины* – это органические вещества, необходимые в небольшом количестве для нормального протекания биохимических и физиологических процессов. Витамины участвуют в регуляции обмена веществ целостного организма через ферментные системы, в состав которых они входят.

Витамины используются в форме лекарственных препаратов для человека и животных.

Известны жирорастворимые (витамин А, D, каротиноиды) и водорастворимые витамины (рибофлавин, тиамин ( $B_2$ ), цианкобаламин ( $B_{12}$ ), биотин, аскорбиновая кислота).



Технология получения жирорастворимых витаминов, локализованных в клеточной мембране, либо находящихся в свободном состоянии в липидных гранулах в цитоплазме, включает стадии гидролиза биомассы и извлечения витаминов ацетоном или другими полярными растворителями. Методом хроматографии проводят их очистку от примесей. Полученный продукт кристаллизуют.

Технология получения микробиологическим путем водорастворимых витаминов включает стадии культивирования микроорганизмов, водной экстракции витаминов из культуральной жидкости, коагуляции белка, упаривания, фильтрации, хроматографическую очистку и кристаллизацию.

Витамины могут оказывать воздействие на персонал при непосредственном контакте. В окружающую среду они могут попадать в основном со сточными водами.

В литературе описаны патологические состояния, связанные как с недостатком витаминов (авитаминозы), так и при поступлении в организм чрезмерно больших количеств витаминов (гипервитаминоз). Витамины могут оказывать аллергическое действие на организм человека.

*Токсины и анатоксины.* Синтезируемые микроорганизмами яды – токсины – могут вызывать специфическую патологию у человека в результате ингибирования отдельных стадий фагоцитарной системы или ее компонентов.

Любые вещества, воздействие которых в небольших концентрациях приводит к заболеванию или гибели живых организмов, называют ядами.

Токсинами называют яды, синтезируемые живыми организмами.

В биотехнологических процессах в основном получают токсины растений, алкалоиды, лектины и гликозиды, которые используются в фармацевтической промышленности для производства лекарств.

При более высоких концентрациях токсины растений являются ядами для животных и человека. Характер биологического воздействия определяется природой токсинов. Так, гликозид нитропропанола, синтезируемый астрагалом, поражает центры головного мозга, ответственные за дыхание и мышечное сокращение. Полициклический хинон, синтезируемый зверобоем, накапливается в наружных тканях животных, делает их чувствительными к ультрафиолетовым лучам, что приводит к сильнейшим ожогам на солнце, дерматитам, вторичной инфекции и гибели.



Наиболее опасны для человека микотоксины, эргоалкалоиды, продуцентом которых является гриб *Claviceps purpurea* (спорынья), трихотецины, продуцируемые грибом р. *Fusarium*. Попадание трихотецинов в организм человека приводит к некрозу тканей пищевого тракта и лейкопении.

У животных, питающихся зерном, зараженным трихотецинами, может угнетаться синтез белка, что приводит к разрушению кожи, сепсису, некрозу слизистых оболочек кишечника, почек, лимфоузлов, костного мозга.

Самыми опасными для человека микотоксинами являются афлатоксины, ингибирующие синтез белка, в частности, афлатоксин В<sub>1</sub>, продуцируемый грибом *Aspergillus flavus*. Афлатоксин и продукт его окисления афлатоксин М<sub>1</sub> в организме коров проникают в молоко и являются причиной цирроза печени у детей.

Микроорганизмы синтезируют как экзотоксины, так и эндотоксины. Эндотоксины синтезируются всеми патогенными микробами, тогда как экзотоксины продуцируются только некоторыми.

К числу микробов, вырабатывающих экзотоксины, относятся возбудители дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae*), столбняка (*Clostridium tetani*), ботулизма (*Clostridium botulinum*), а также продуцент афлатоксина *Aspergillus flavus* и др.

По химическому составу экзотоксины бактерий – это высокополимерные термолабильные белки. Эндотоксины, обладающие высокой степенью селективности, представляют собой липополисахариды. Токсины грибов имеют небелковую природу. Базидиальные грибы образуют различные азотистые (небелковые) ядовитые продукты, например, мускарины и мускаридины.

Ядовитые свойства токсинов объясняются наличием в их молекуле активного центра, состоящего из определенных аминокислот. Так, в молекуле столбнячного токсина – 4 аминокислоты: тирозин, гистидин, триптофан, лизин. Блокирование активного центра приводит к утрате токсичности. При этом сохраняется другой биологически активный центр, ответственный за антигенные свойства. Это позволило разработать метод получения *анатоксина* (или *токсоида*) – препарата, лишённого токсичности, – путем обработки исходного токсина формалином, который блокирует только токсический центр. Анатоксины широко применяются для получения антисывороток, для выработки антитоксического иммунитета с целью профилактики дифтерии, столбняка, ботулизма и других заболеваний, связанных с интоксикацией организма.



Технология получения анатоксинов включает стадии культивирования патогенного микроорганизма, обезвреживания формалином токсина, содержащегося в культуральной жидкости, отделения клеток сепарированием, концентрирование и очистку анатоксина при использовании сорбентов.

Технология получения токсических белков (пестицидов) энтомопатогенных бацилл *Bacillus thuringiensis*, образующихся в процессе спорообразования, включает следующие стадии: глубинное культивирование бацилл; отделение сепарированием от культуральной жидкости биомассы, содержащей споры; высушивание биомассы с каолином в качестве наполнителя. Препарат может использоваться и в виде пасты.

При получении стимуляторов роста растений, например, гибберелловой кислоты, синтезируемой грибом *Fusarium moniliforme*, или регулятора роста растений фузикоцина (карботрициклический дитерпен), образуемого грибом, в технологических процессах используются, соответственно, стадия вакуум-упаривания культуральной жидкости, стадия экстракции хлороформом или другими растворителями биологически активных веществ, очистка сорбентами и кристаллизация. Продукты биосинтеза как компонент биологического фактора в основном загрязняют жидкостные потоки.

Как органические соединения, эти продукты могут оказывать аллергическое воздействие на человека.

*Гормоны* – биологически активные вещества органической природы, определяющие состояние физиологических функций целостного организма, оказывающие регулирующее влияние на обмен веществ, на сохранение гомеостаза организма.

Среди гормональных препаратов имеется группа пептидных и белковых гормонов, стероидные соединения и производные жирных кислот (простагландины).

Наиболее важными являются гормоны кортикостероиды, прогестогены, эстрогены и андрогены, которые принимают участие в регуляции практически всех жизненно важных функций организма и характеризуются широким спектром и избирательностью физиологического действия.

Стероиды малорастворимы в воде, поэтому при их производстве применяют методы, повышающие их растворимость (использование растворителей, водорастворимых солей и др.).

*Аллергены* подразделяются на микробные, растительные и животные. Они используются для диагностики патологических процессов, в развитии которых лежит сенсibilизация макроорганизма. На-



тивные аллергены представляют либо взвесь убитых клеток бактерий, либо растворимые продукты метаболизма. Очищенные аллергены – это осажденные и лиофильно высушенные термостабильные белоксодержащие фракции фильтратов жидких культур бактерий. Данные препараты могут оказывать аллергенное действие на персонал.

### Контрольные вопросы

1. Санитарно-гигиеническая характеристика живых клеток микроорганизмов.
2. Санитарно-гигиеническая характеристика инактивированных клеток микроорганизмов.
3. Санитарно-гигиеническая характеристика продуктов метаболизма.
4. Характеристика облигатных и факультативных паразитов.
5. Характеристика патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.
6. Значение нормальной микрофлоры человека.
7. Факторы патогенности бактерий.
8. Факторы патогенности грибов.
9. Понятие вирулентности и факторы вирулентности.
10. Что такое инфекционный процесс?
11. Понятие «инфицирующая доза».
12. Формы инфекций (от вида возбудителя, от места локализации в макроорганизме, от резервуара возбудителя).
13. Механизм передачи инфекции.
14. Понятие иммунитета. Формы иммунитета.
15. Механизмы формирования иммунитета.
16. Что такое антиген? Основные свойства антигена.
17. Роль лимфоцитов в иммунной системе.
18. Что означает понятие «сенсibilизация»?
19. Иммунитет: врожденный и приобретенный.
20. Что такое аллергия?
21. Иммунопрофилактика. Типы вакцин.
22. Генномодифицированные микроорганизмы. Проблемы их использования.
23. Характеристика экзометаболитов микроорганизмов.
24. Характеристика эндометаболитов микроорганизмов.
25. Антибиотики: классификация и механизм действия.
26. Промышленные ферментные препараты. Их применение и воздействие на организм.
27. Токсины и анатоксины микроорганизмов.



## **5. Гигиеническое обеспечение биологической безопасности биотехнологических производств**

Обеспечение безопасности биотехнологических процессов и производств для персонала, окружающей среды и населения начинается при подготовке проектной документации на строительство объекта с разработки раздела «Охрана окружающей среды», в соответствии с утвержденными нормативными документами и другими нормативными актами. В разделе отражаются: общая экологическая обстановка в районе, оценка воздействия строительства и эксплуатации объекта на окружающую среду (ОВОС), решения по обеспечению технической безопасности, предупреждению и ликвидации последствий возможных аварийных ситуаций, мероприятия по охране окружающей среды и рациональному использованию природных ресурсов, в том числе по охране атмосферного воздуха от загрязнения; по охране и рациональному использованию поверхностных и подземных вод, земель; по охране недр, охране животного и растительного мира от воздействий шума, ультразвука, вибрации и электромагнитных излучений.

Нормативные документы и рекомендации по охране окружающей среды, которые могут быть использованы при разработке раздела, зависят от назначения строящегося предприятия.

Основными документами являются Конституция Российской Федерации, принятая 12.12.93 г., Кодексы РФ (земельный, водный, лесной), Федеральные законы:

- Об охране окружающей природной среды;
- Об охране атмосферного воздуха;
- Об охране и использовании животного мира;
- Об охране и использовании памятников истории и культуры;



- О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера.  
а также нормативные документы Госкомэкологии России:
- Руководство по проведению оценки воздействия на окружающую среду (ОВОС) при выборе площадки, по разработке проектов строительства хозяйственных объектов и комплексов;
- Природоохранные нормы и правила проектирования;
- Правила охраны поверхностных вод от загрязнения сточными водами;
- Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов;
- Гигиенические нормативы содержания веществ в окружающей среде. Постановление Правительства РФ №881 от 30.12.2006.

В соответствии с перечисленными документами, меры безопасности при работе с биологическими объектами должны обеспечивать предупреждение возникновения у работающих и населения:

- заболеваний, состояния носительства, интоксикации, вызванных микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности, а также культурами клеток и тканей;
- сенсibilизации организма, вызванной микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности.

Безопасность труда при работе с опасными биологическими объектами обеспечивается технологией производственного процесса, производственным оборудованием, средствами защиты и системой специальных профилактических мероприятий.

Производственные процессы должны:

- допускать возможность обеззараживания или обезвреживания территории, помещений, оборудования, транспортных средств, одежды и средств защиты применительно к специфике работы с данным биологическим объектом;
- допускать возможность контроля условий труда и соблюдения гигиенических требований;
- исключать неблагоприятное воздействие методов работы с биологическими объектами на персонал;
- исключать возникновение пожаров и взрывоопасных ситуаций при выделении продуктов жизнедеятельности и распада биологических объектов;
- исключать возможность загрязнения внешней среды.



Производственное оборудование должно соответствовать санитарно-гигиеническим и эргономическим требованиям, а именно:

- обеспечивать возможность контроля за проведением измерений конкретных параметров биологической опасности в целях сопоставления их с соответствующими предельно допустимыми величинами;
- допускать возможность контроля за физиологическим состоянием и поведением биологического объекта;
- допускать возможность обеззараживания и обезвреживания.
- Система специальных профилактических мероприятий должна:
- обеспечивать возможность создания у работающих с патогенными микроорганизмами специфического активного или пассивного иммунитета;
- обеспечивать нормирование продолжительности труда во вредных условиях;
- обеспечивать возможность повышения сопротивляемости организма (профилактическое питание).

Для предупреждения вредного воздействия микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности на персонал требования безопасности предъявляются к следующим видам работ:

- производству и контролю биологических препаратов, основой или продуцентами которых являются микроорганизмы, биологические жидкости, ткани и органы, а также культуры клеток и тканей;
- исследованию препаратов для профилактики, лечения, диагностики и других целей в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и др.

В стандартах по безопасности труда на каждый вид работ с биологическими объектами устанавливаются параметры биологической опасности и их допустимые значения, а также методы их измерения и контроля, т. е. должны быть разработаны гигиенические нормативы.

Гигиенический норматив – это количественный показатель предельно допустимой концентрации (ПДК) вредных производственных факторов и факторов окружающей среды, выявленный по интенсивности или длительности воздействия, не оказывающий неблагоприятного воздействия на человека.



## **5.1. Санитарно-гигиеническая оценка биологического объекта и готовых продуктов, включающих живые клетки продуцента**

Использование биологического объекта в биотехнологических процессах определяет специфику технологии производств, специфику их гигиенической и санитарной оценки.

Особенность гигиенической оценки биологических объектов биотехнологических производств заключается в том, что оцениваются не только патогенные, но и непатогенные, сапрофитные штаммы микроорганизмов.

Гигиеническому нормированию подлежат штаммы микроорганизмов, используемые или предполагаемые к использованию в биотехнологических процессах. Нормированию также подлежат готовые формы препаратов, действующим началом которых являются живые микроорганизмы или их споры.

### **5.1.1. Комплексная оценка промышленных штаммов**

Изучение штаммов-продуцентов включает изучение их микробиологических, технологических, санитарно-гигиенических и экологических свойств. Схема испытаний штаммов, перспективных для внедрения в производство, представлена на рис. 5.1.

На этапе микробиологических исследований (этап 1) определяется таксономическое положение штамма, разрабатываются методы его идентификации в промышленном процессе и окружающей среде, определяются условия его доминирования в случае незащищенных условий культивирования.

Изучение технологических свойств штамма (этап 2) направлено на определение его промышленно-ценных свойств.

При санитарно-гигиенических исследованиях (этап 3) определяется патогенность штамма, его вирулентность, ПДК аэрозоля живых и инактивированных клеток в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе.

Экологотоксикологические исследования (этап 4) включают определение приживаемости клеток продуцента в экосистемах, изучение их влияния на биоценоз экосистем – определение предельно допустимой экологической нагрузки.



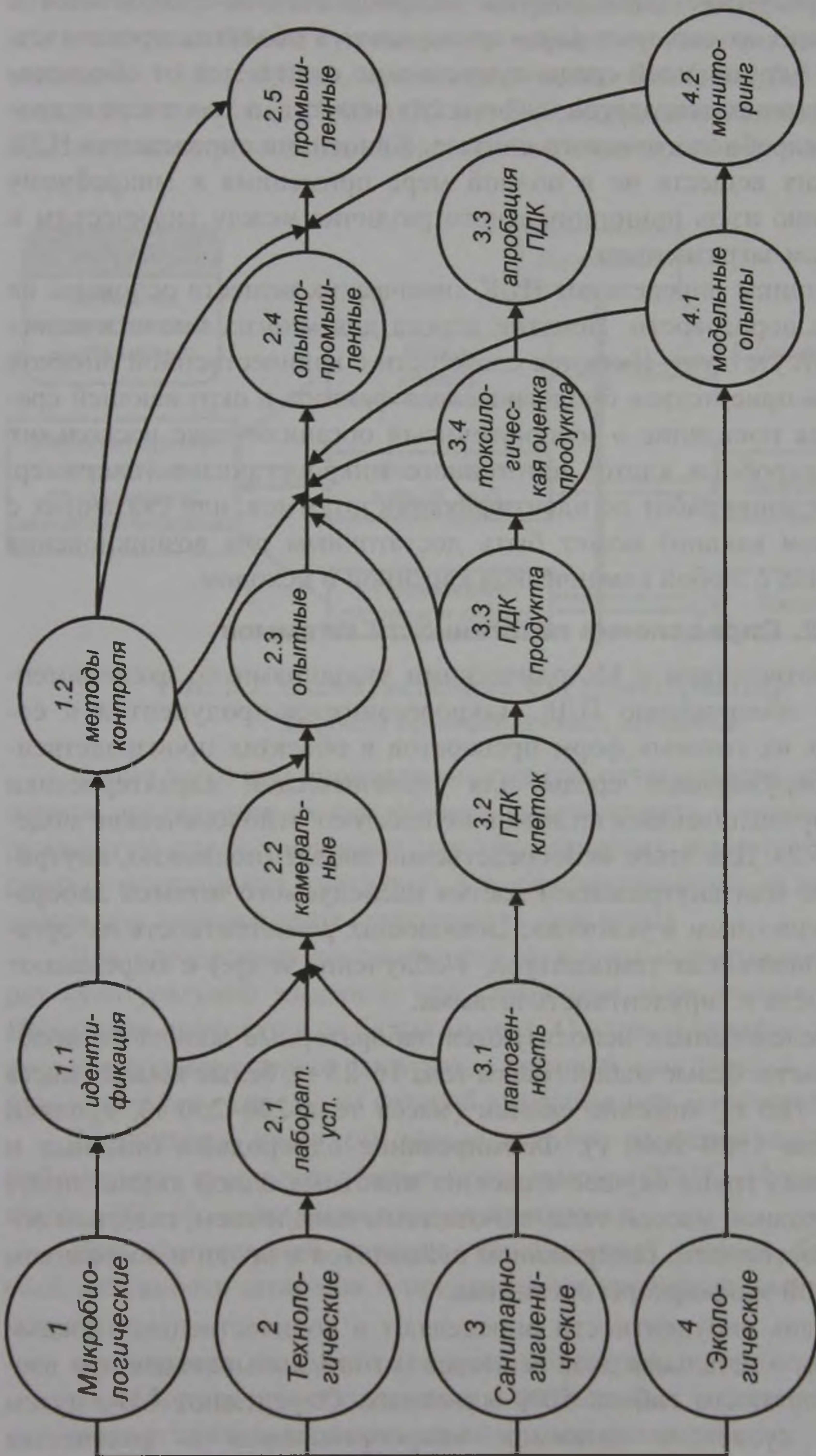


Рис. 5.1. Схема испытаний новых штаммов, перспективных для внедрения в производство



*Гигиеническое нормирование микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов* в объектах производственной и окружающей среды существенно отличается от обоснования санитарных стандартов химических веществ, в том числе и продуктов микробиологического синтеза. Концепция определения ПДК химических веществ не в полной мере применима к микробному загрязнению из-за принципиального различия между химическим и микробным загрязнением.

Принципы определения ПДК химических веществ основаны на принципе пороговости. Понятие порога для многих биологических агентов отсутствует. Имеются сложности с количественной оценкой опасности присутствия биологического фактора в окружающей среде, так как попадание в восприимчивый организм даже нескольких живых микробных клеток патогенного микроорганизма (например, при проведении работ по идентификации штаммов, или связанных с получением вакцин) может быть достаточным для возникновения заболевания с любой клинической картиной и исходом.

### **5.1.2. Определение патогенности штаммов**

В соответствии с Методическими указаниями по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды для гигиенической характеристики свойств промышленных штаммов используют этиологические модели (рис. 5.2). Для этого непосредственно вводят (подкожно, внутрибрюшинно или внутривенно) клетки исследуемого штамма лабораторным животным в условиях, снижающих резистентность их организма (пониженная температура,  $\gamma$ -облучение и др.) и определяют патогенность и вирулентность штамма.

В исследованиях используются лабораторные животные молодого возраста: белые мыши (масса тела 16–18 г), белые крысы (масса тела 160–180 г), морские свинки (масса тела 200–250 г), кролики (масса тела 1500–2000 г). Формирование однородных опытных и контрольных групп осуществляют из животных одной линии (популяции) с равной массой тела, однотипным поведением, сходным общим их состоянием, содержанием лейкоцитов в крови и состоянием нормальной микрофлоры организма.

Степень вирулентности определяют в количественных показателях  $LD_{50}$  – летальная доза вещества (мг/кг), вызывающая при введении в организм гибель 50% животных. Определяют  $LD_{50}$  путем введения суспензии штаммов микроорганизмов в количестве



$10^4$ – $10^8$  клеток на одно животное интраназально, внутрибрюшинно или в желудок. Объем суспензии составляет: при внутрибрюшинном введении – 1,0 и 3,0 мл, при интраназальном – 0,007–0,05 мл, при введении в желудок – 0,05–0,25 мл. Наблюдения за выживаемостью опытных животных и их общим состоянием проводятся в течение 30 суток.

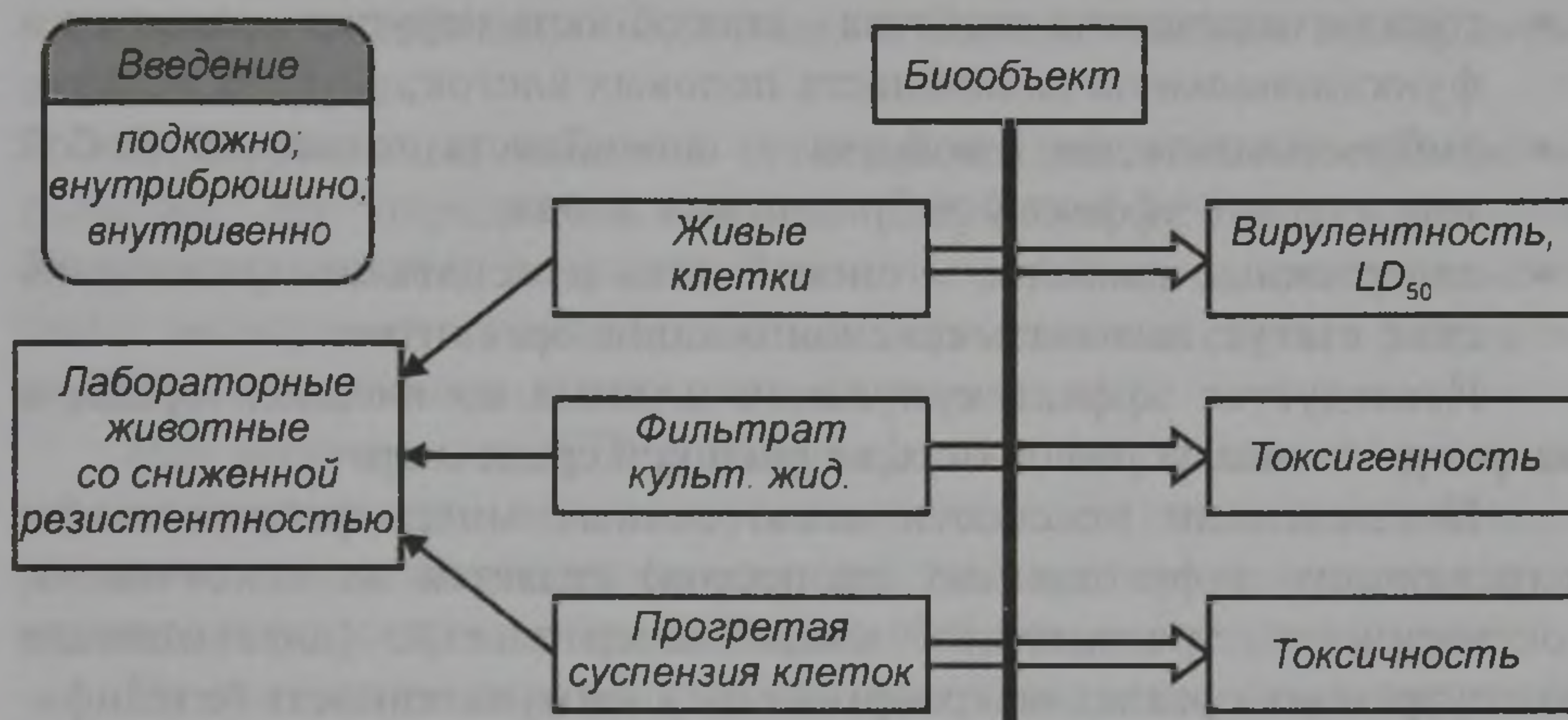


Рис. 5.2. Схема гигиенической характеристики свойств промышленных штаммов

Кроме того, при определении степени патогенности микроорганизмов исследуется их способность синтезировать и выделять в окружающую среду токсичные для теплокровных животных экзотоксины (токсигенность культуры), а также эндотоксины, освобождающиеся при лизисе клеток (токсичность культуры).

Для определения токсигенности культуры испытывается фильтрат культуральной жидкости при глубинном выращивании штамма. Испытания проводятся на белых мышах. Опытным группам животных вводят внутрибрюшинно фильтрат, а контрольным группам – стерильную питательную среду, на которой выращивались микроорганизмы.

Токсичность культуры определяют при введении мышам внутрибрюшинно суспензии убитых прогреванием ( $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 мин) клеток в дозах  $10^5$ – $10^7$  клеток или спор на животное.

При комплексной токсико-гигиенической оценке биологической активности штаммов и продуктов их жизнедеятельности определяется:

- токсичность штаммов (острая, подострая, хроническая), т. е. способность при попадании в определенных количествах в живые организмы вызывать их интоксикацию и гибель;



- канцерогенные свойства – способность индуцировать возникновение злокачественных опухолей;
- мутагенные свойства – способность вызывать мутации в соматических и половых клетках;
- тератогенные свойства – способность вызывать структурные трансформации или дефекты зародыша или плода;
- гонадотоксические свойства – способность нарушать развитие и функциональную способность половых клеток;
- эмбриотоксические свойства – способность вызывать любой токсический эффект у эмбриона или плода;
- аллергенные свойства – способность изменять иммунологический статус, вызывать сенсibilизацию организма.

Исследуется эффект кумуляции штамма во внешней среде, в макроорганизме, устойчивость во внешней среде и др.

Показателями опасности непатогенных микроорганизмов (не вызывающих инфекционных процессов) является их токсичность, токсигенность, транзиторное микробоносительство (диссеминация во внутренних органах макроорганизма), иммуногенность (специфическое влияние на иммунную систему) и дисбиотическое действие (специфическое влияние на нормальную микрофлору организма).

### **5.1.3. Обоснование ПДК живых клеток микроорганизмов в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе**

Схема проведения исследований по обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе предусматривает несколько этапов. На первом этапе выявляются признаки патогенности объекта, определяется вирулентность по величине  $LD_{50}$ , токсичность и токсигенность (рис. 5.2).

На втором этапе оценивается опасность изучаемого микроорганизма при поступлении в организм лабораторных животных путями, адекватными реальным условиям трудовой деятельности и жизни человека, с целью выбора лимитирующего критерия вредности (иммунотоксического, дисбиотического или по диссеминации микроба во внутренних органах). В результате проведенных исследований обосновывается величина ПДК.

Критериями высокой опасности штамма (1 класс опасности) являются:

- величина  $LD_{50}$  при введении микроорганизма в желудок мышей менее  $10^7$ , а при внутрибрюшинном – менее  $10^5$  клеток на одно животное;



- выраженная токсичность – величина  $LD_{50}$  при введении убитой нагреванием культуры менее  $10^6$  клеток на животное;
- выраженная токсигенность – величина  $LD_{50}$  при внутрибрюшинном введении фильтрата менее 0,5 мл на животное.

Если гибели животных не наблюдается, то для достоверности оценки степени патогенности штаммов определяется вирулентность и на группе ослабленных животных с использованием экспериментальных нагрузок.

Невирулентные штаммы исследуются на возможность носительства. Это определяется путем инкубации посевов в течение 30 суток из кожных покровов, слизистых оболочек, крови, печени, почек экспериментальных животных. При положительных результатах штамм не рекомендуется для использования.

*При обосновании ПДК готовых форм препаратов, содержащих живые микроорганизмы или споры* в дополнение к описанным исследованиям оценивается раздражающее действие препарата на кожу, определяется порог острого и хронического общетоксического действия.

На основании полученных данных выявляется лимитирующий показатель вредности, который лежит в основе гигиенического нормирования этих штаммов и продуктов.

*Широкие исследования промышленных непатогенных штаммов и продуктов, представляющих биомассу их инактивированных клеток, показали, что в основе проявлений неблагоприятного их воздействия на макроорганизм лежит возможность сенсibilизации организма.*

Сенсibilизация как состояние повышенной чувствительности развивается у некоторых людей в ответ на повторное введение аллергенов и зависит от характера и свойств аллергена, его количества, пути проникновения и особенностей реактивности макроорганизма.

Выявление сенсibilизирующего действия микроорганизмов штаммов-продуцентов проводится с живой культурой.

При оценке готовых форм препаратов для сенсibilизации животных применяется суспензия препаратов (учитывается при этом также эффект наполнителя или добавок, или растворы химических соединений, входящих в препарат), а также используется живая культура (учитывается эффект воздействия штамма-продуцента).

Сенсibilизирующее действие определяется воспроизведенным аллергией при повторном введении аллергена.

Мыши (10–20 особей) сенсibilизируются интраназально или энтерально взвесью клеток микроорганизмов в концентрации на по-



рядок ниже  $LD_{50}$ . Через 5 суток животные опытной группы тестируются путем введения в заднюю лапку 0,05 мл взвеси исследуемого микроорганизма в той же концентрации, что и при сенсibilизации. Через сутки определяется разница отека двух задних лапок опытных и контрольных групп животных.

При определении сенсibilизирующего действия готовой формы препарата для сенсibilизации животных используется интраназальное или энтеральное введение препарата в концентрации на порядок ниже величины  $LD_{50}$ , а также ингаляционное воздействие в концентрациях, выбранных для определения  $Lim_{ac}$  (порога острого действия). Тестирование проводится методом повторного введения препарата.

*Для установления порога хронического общетоксического действия ( $Lim_{ch}$ )* животные, сенсibilизированные суспензией изучаемого микроорганизма, подвергаются в течение 4 месяцев в специальных камерах ингаляционному воздействию аэрозолем, содержащим клетки этого же микроорганизма. Ежедневная экспозиция при установлении ПДК в воздухе рабочей зоны – 4 часа, а для ПДК в атмосферном воздухе – круглосуточно.

Порог иммунотоксического действия определяется на основании исследования возможного появления у животных следующих эффектов: сенсibilизации, иммунизации (признак антигенности микроорганизма) и неспецифической иммуномодуляции (стимуляция и иммунодефицит) организма.

Оценка антигенности микроорганизмов осуществляется на основе определения иммунных антител изучаемого микроба в реакциях агглютинации и фагоцитоза нейтрофилами крови.

При реакции агглютинации исследуется агглютинация сыворотки крови животных опытной (сенсibilизированной) и контрольной групп при взаимодействии с взвесью живых клеток культуры микроорганизма.

При реакции фагоцитоза подсчитывается формула крови сенсibilизированных и контрольных животных и определяется доля фагоцитирующих нейтрофилов и индекс активности фагоцитоза (отношение общего числа фагоцитированных клеток микроба и числа фагоцитирующих нейтрофилов).

Для оценки иммуномодулирующего эффекта определяется в крови и лимфоидных органах содержание лимфоцитов и их популяций, Т- и В-лимфоцитов.

За пороговую концентрацию микроорганизмов принимается та, которая вызывает сенсibilизацию 30% животных, увеличение им-



мунного ответа организма и достоверное изменение (как увеличение, так и снижение) неспецифического иммуномодулирующего действия.

Определение порога диссеминации микроорганизмов во внутренних органах осуществляется в конце хронического эксперимента и через две недели после его окончания (период восстановления). Для этого проводится посев крови и используется метод отпечатков легких, сердца, печени, селезенки и почек на агаризованную селективную среду.

За пороговую принимается минимальная доза или концентрация, при которой через 2 недели после окончания хронического эксперимента исследуемый микроорганизм высевается из внутренних органов или в них обнаруживаются патоморфологические изменения.

Величина ПДК устанавливается исходя из лимитирующего порога хронического действия микроорганизма (иммунотоксического, дисбиотического и диссеминации во внутренних органах). Коэффициент запаса при определении ПДК в воздухе рабочей зоны принимается равным 10, а при определении ПДК в атмосферном воздухе – 100.

Класс опасности микроорганизмов устанавливается согласно табл. 5.1 и ставится пометка «А» (аллерген), если при нормировании лимитирующим признаком является сенсibiliзирующее действие.

### 5.1. Классификация штаммов микроорганизмов по степени опасности

Наименование показателя	Един. измерения	Нормы для класса опасности			
		1-го	2-го	3-го	4-го
Средняя вирулентная доза: при введении в желудок	кл/животное	до $10^7$	$10^7-10^9$	$10^9-10^{11}$	более $10^{11}$
при введении внутрибрюшинно		до $10^5$	$10^5-10^7$	$10^7-10^9$	более $10^9$
Средняя аллергенная доза по сенсibiliзирующему эффекту	кл/животное	до $10^2$	$10^2-10^3$	$10^3-10^4$	более $10^4$
Порог аллергенного ингаляционного действия	кл/м <sup>3</sup>	до $10^3$	$10^3-10^4$	$10^4-10^5$	более $10^5$
Порог хронического ингаляционного действия	кл/м <sup>3</sup>	до $3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3-3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4-3 \cdot 10^5$	более $3 \cdot 10^5$
ПДК штаммов микробов: в воздухе рабочей зоны;	кл/м <sup>3</sup>	до 200	200–2000	2000–20000	более 20000
в атмосферном воздухе	кл/м <sup>3</sup>	до 20	20–200	200–1000	до 2000



Микроорганизмы-продуценты и готовые продукты на их основе, отнесенные к 1 классу опасности не разрешаются к использованию в производстве.

1-й класс – чрезвычайно опасные микроорганизмы, обладают выраженным общетоксическим и аллергенным действием;

2-й класс – высокоопасные, могут оказывать сильное аллергенное и общетоксическое действие;

3-й класс – умеренные, обладают слабым общетоксическим и аллергенным действием;

4-й класс – малоопасные, практически не обладают аллергенным и общетоксическим действием.

Все промышленные штаммы, разрешенные к применению, относятся к непатогенным или к условно-патогенным (кроме штаммов, используемых для получения вакцин). В соответствии с нормативно-технической документацией, их относят к 3 классу опасности (умеренный индивидуальный риск и ограниченный риск для населения в целом). Такие микроорганизмы при нарушении ведения технологического процесса, санитарно-гигиенических условий труда могут оказывать неблагоприятное влияние на организм работающих и приводить к микробоносительству и аллергии.

Наиболее широкие санитарно-гигиенические исследования проведены с дрожжами р. *Candida*, которые использовались в крупнотоннажных производствах кормового белка из различных видов сырья (углеводороды, гидролизаты растительного сырья, этанол и др.). Среди 80 видов дрожжей р. *Candida* штаммы варьируют по степени патогенности от безвредных до вирулентных. Для человека патогенными являются *Candida albicans*. Отдельные патогенные штаммы выявлены также среди *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*. Дрожжи р. *Candida* широко распространены в природе. Являясь сапрофитной микрофлорой, дрожжи обитают на кожных покровах, на слизистой оболочке рта, в верхних дыхательных путях, половых органах, в кишечнике и т. д. Присутствие дрожжевых клеток в воздухе рабочей зоны может приводить к носительству среди персонала и алергизации к ним.

По данным гигиенических обследований конца XX века, частота обнаружения дрожжей р. *Candida* на слизистых оболочках у людей разного возраста (18–30 лет), не связанных с биотехнологическим производством, составляла 53%, что свидетельствует о роли этого рода дрожжей в «естественной» сенсibilизации населения. Специфическая патология развивается на фоне измененного иммунологического статуса, измененной реактивности организма эндогенной или экзогенной природы.



Санитарно-гигиенические обследования крупнотоннажных производств, использующих в качестве продуцентов непатогенные штаммы дрожжей р. *Candida*, показали, что промышленные штаммы могут вызывать сенсibilизацию организма. Среди рабочих выявлялись такие заболевания, как катаральные фарингиты, хронические бронхиты, пневмонии, в отдельных случаях – кандидозные ангины. Поражения бронхо-легочного аппарата сопровождались нарушениями иммунного статуса.

На основании санитарно-гигиенических исследований промышленных углеводородокисляющих штаммов дрожжей р. *Candida* определена ПДК клеток в воздухе рабочей зоны, которая не должна превышать  $5 \cdot 10^2$  кл/м<sup>3</sup> воздуха.

Бактерии метилотрофы *Methylococcus capsulatus* и *Acetobacter methylicus*, используемые в качестве продуцентов при культивировании на природном газе и метаноле, отнесены к 4-му классу опасности (средневирулентная доза при внутрибрюшинном введении – более  $10^9$  кл/кг). ПДК в воздухе рабочей зоны установлена на уровне  $2 \cdot 10^4$  кл/м<sup>3</sup>.

Помимо класса опасности и ПДК тех или иных загрязнений, для оценки их воздействия на организм человека устанавливаются также и другие показатели:

- величина превышения допустимой суточной дозы (ДСД) поступления поллютанта в организм от максимально допустимого уровня (в мг/кг массы тела);
- ориентировочно-допустимый уровень фактора воздействия (ОДУ) в воде водоемов (в мг/дм<sup>3</sup>);
- ориентировочно-безопасный уровень фактора воздействия в воздухе рабочей зоны и в воздухе атмосферы (в мг/м<sup>3</sup>);
- ориентировочно допустимое количество фактора воздействия (ОДК) в почве (в мг/кг).

Поскольку отдельные патогенные штаммы выявляются среди непатогенных дрожжей одного и того же вида, теоретически возможным является спонтанное вытеснение промышленного непатогенного штамма другим вирулентным штаммом. Большое значение для обеспечения безопасных условий труда персонала имеет проведение регулярного микробиологического контроля технологического процесса с целью обеспечения доминирования производственных штаммов-продуцентов в этих процессах.



## **5.2. Санитарно-гигиеническое нормирование биотехнологических продуктов, содержащих инактивированные клетки**

Принципы токсикологической оценки продуктов микробиологического синтеза, основой которых являются инактивированные клетки микроорганизмов или продукты их метаболизма (кормовые белковые продукты, аминокислоты, антибиотики, ферменты и т. д.), основаны на методах, аналогичных применяемым при обосновании гигиенических регламентов химических веществ.

В эксперименте изучают токсикологические, эмбриотропные, канцерогенные, тератогенные, сенсibiliзирующие и другие свойства продуктов.

Как показали исследования, продукты биосинтеза микроорганизмов не влияют на генеративную функцию организма, не обладают канцерогенным эффектом, а по токсикометрическим параметрам относятся к веществам, у которых лимитирующим показателем потенциальной опасности является сенсibiliзирующий эффект.

### **5.2.1. Определение сенсibiliзирующих свойств «биологического фактора» и установление порога аллергического воздействия**

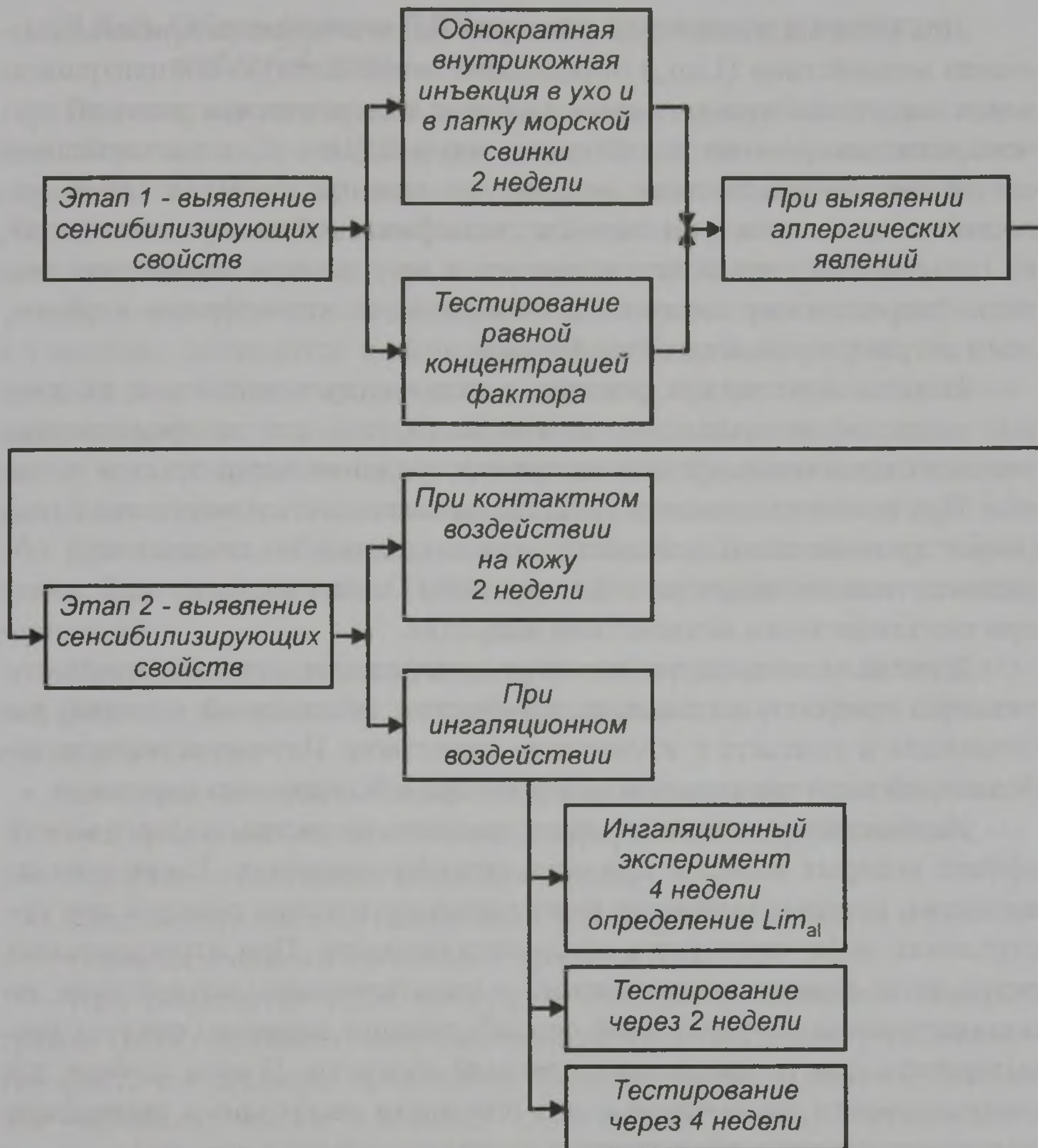
Исследования по выявлению сенсibiliзирующих свойств и установлению порогов аллергического действия проводятся на молодых морских свинках (массой тела 220–250 г). Количество животных в опытных и контрольной группах должно быть не менее 8–10 особей. Изучение сенсibiliзирующего действия осуществляют в несколько этапов (рис. 5.3).

Первичная оценка проводится при однократной внутрикожной сенсibiliзации исследуемым фактором в виде мази или растворов (40 мкг вещества в 0,02 мл растворителя вводится с помощью шприца в кожу наружной поверхности уха или 500 мкг в 0,2 мл в виде масел и вакцин в подушечку задней лапки морской свинки). Через две недели получают ответ о наличии или отсутствии аллергических свойств у исследуемого препарата.

Тестирование проявления аллергических свойств фактора проводится при нанесении одной капли испытуемых веществ в разной концентрации на боковые поверхности тела животного.

В случае выявления аллергических свойств методами внутрикожной сенсibiliзации обязательным является проведение 2-го этапа – изучения опасности развития аллергии при контактном и ингаляционном воздействии.





**Рис. 5.3.** Схема проведения исследований по выявлению сенсibilизирующих свойств продуктов и установления порогов аллергенного действия

Определение аллергических свойств при контакте фактора с кожей проводят на основании выявления раздражающего действия при нанесении 3-х капель испытуемого вещества (в разной концентрации) на освобожденную от шерсти кожу боковой поверхности в течение 2-х недель. Выявление аллергии проводится методом кожных проб, а также при дополнительном гистологическом исследовании. Реакция кожи учитывается ежедневно.



Для установления порога аллергического эффекта при ингаляционном воздействии ( $Lim_{al}$ ) определяют минимальную концентрацию вещества, способную вызывать развитие аллергических реакций при четырехнедельном ингаляционном воздействии. Для тестирования состояния сенсибилизации используют кожные пробы, а также дополнительно используют методы специфической алергодиагностики (реакция пассивной агглютинации и др.), и неспецифические методы (определение количества базофилов и эозинофилов в крови, доли дегранулированных базофилов и др.).

Если аллергические реакции у подопытных животных на данное вещество не выявлены, то считается, что оно не представляет опасности для макроорганизма при поступлении через органы дыхания. При положительном результате сопоставляются величины  $Lim_{ch}$  (порог хронического действия), установленные по показателям общетоксического эффекта и  $Lim_{al}$  (порог аллергического действия) при ингаляционном воздействии вещества.

Итогом исследования является определение степени опасности развития профессиональных аллергических заболеваний у людей, работающих в контакте с изучаемым веществом. Изучается частота заболеваний и случаи скрытой аллергии при обследовании персонала.

Наибольшую опасность представляют вещества, аллергический эффект которых выявлен при всех способах введения. Также опасны вещества, которые вызывают развитие аллергических реакций при поступлении либо через кожу, либо ингаляционно. При отрицательных результатах поверхностно-кожного и ингаляционного воздействия, но положительной внутрикожной сенсибилизации вещество следует рассматривать как потенциально опасный аллерген. В этом случае для окончательного заключения о его опасности необходимо проведение алергологического обследования контактирующих с ним лиц.

При установлении ПДК аллергенов в воздухе рабочей зоны придерживаются следующих положений.

1. Если результатами экспериментального ингаляционного воздействия или алергологического обследования работающих показано, что величина  $Lim_{al}$  выше или равна  $Lim_{ch}$ , то уровень ПДК следует устанавливать по токсическому действию с отметкой «аллерген».

2. Если же  $Lim_{al}$  испытуемого вещества ниже  $Lim_{ch}$  (не менее чем в 3–5 раз), то ПДК должна устанавливаться ниже  $Lim_{al}$  с учетом концентрации препарата, не оказывающей аллергического эффекта, и с отметкой «аллерген».



### 5.2.2. Обоснование ПДК сухого препарата в воздухе рабочей зоны

При токсикологической оценке готового сухого препарата с целью обоснования его ПДК в воздухе рабочей зоны проводятся экспериментальные исследования, гигиеническая оценка условий труда, обследование состояния здоровья работающих, а также разрабатывается методика определения содержания препарата в воздухе.

При экспериментальной оценке токсичности препарата в течение 4-х месяцев проводится ингаляционная затравка белых крыс, определяется  $Lim_{ch}$  – порог хронического действия препарата с использованием специфических микробиологических и иммунологических тестов, а также определяется его аллергенность. На основании экспериментальных данных обосновывается ПДК, которую выражают в  $мг/м^3$ .

Для веществ, обладающих аллергенным действием, и антибиотиков при установлении ПДК принимается коэффициент запаса, равный 10.

При гигиеническом изучении условий труда и состояния здоровья рабочих производств микробных препаратов особенно обращается внимание на:

- продолжительность воздействия пыли препарата (кратковременное, прерывистое, длительное, непрерывное) на работающих;
- агрегатное состояние пыли препарата;
- содержание пыли и микробных тел на рабочих местах с учетом технологического процесса и времени года.

При разработке ПДК продуктов белково-витаминных концентратов (БВК) крупнотоннажных производств (паприна) учитывался тот факт, что штаммы дрожжей р. *Candida*, являясь непатогенными для человека, имеют сложный антигенный состав. Установлено большое количество общих антигенов и их комплексов у разных видов дрожжей р. *Candida*, что приводит к перекрестным иммунологическим реакциям, а также не исключает и возможное развитие ауто-сенсibilизации при длительном контакте с дрожжами. Экспериментальными исследованиями доказана зависимость характера динамики и интенсивности аллергической перестройки организма от концентрации и пути введения антигенного комплекса дрожжей.

Химические методы определения общего белка (метод Лоури и др.) не обеспечивают надежного контроля выбросов предприятий микробиологического синтеза вследствие недостаточно высокой чувствительности метода и полного отсутствия специфичности, учитывая, что в окружающей среде кроме белка исследуемого продукта,



всегда присутствуют белки другого происхождения (пыльца растений, пыль и др.).

Для оценки и контроля загрязненности окружающей среды продуктами микробного синтеза разработан иммунологический метод, который основан на широко применяемой в медицинской практике реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Для проведения РНГА используют иммуноглобулиновые эритроцитарные диагностикумы (ИЭД).

Реакция непрямой гемагглютинации используется как для определения и индикации неизвестного возбудителя или его антигеноактивных веществ, так и для диагностики аллергических состояний организма. В этих случаях используют эритроциты, нагруженные специфическими антителами к соответствующим микроорганизмам, их антигенам, белковым веществам и др., и эритроциты, сенсibilизированные антигенами разных групп микроорганизмов.

Реакция гемагглютинации протекает в две фазы: первая фаза – специфическая, когда происходит соединение антигенных детерминант с активными центрами антител; вторая фаза – следствие первой при наличии связи антиген-антитело, в которой эритроциты образуют агрегат и выпадают в осадок – агглютинируют.

Иммуноглобулиновый эритроцитарный диагностикум готовится на основе антител к готовому продукту и продуценту. Высокоспецифичные сыворотки, содержащие антитела, получают при иммунизации кроликов вакцинами, приготовленными на основе клеточных стенок дрожжей *Candida maltosa* (10 мг/мл), целых клеток (60 млн. кл/мл), гомогената готового продукта (10 мг/мл), гомогената мелкодисперсной фракции продукта (аналог пылегазовоздушных выбросов сушильных установок перед скрубберами Вентури – 10 мг/мл). Из наиболее активных специфичных сывороток выделяются иммуноглобулины для последующей конъюгации их с эритроцитами. Эритроциты, полученные из крови барана, стабилизируют для исключения возможной спонтанной их агглютинации и устойчивости к гемолизу.

Далее готовят ИЭД, присоединяя иммуноглобулины к эритроцитам (сенсibilизация) с помощью конъюгирующих агентов ( $\text{CrCl}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Минимальная агглютинирующая доза антигена составляет 0,002–0,006 мкг белка в мл. Наибольшей активностью обладали антитела, выделенные из иммунной сыворотки, сенсibilизированной гомогенатом готового продукта, наименьшей – вакциной из клеточных стенок дрожжей.



Данный метод сочетает высокую чувствительность, специфичность и позволяет выявить антиген продукта в концентрации 0,02–0,04 мкг белка в 1 м<sup>3</sup>. При использовании данного метода были разработаны ПДК белка паприна (дрожжевая биомасса, полученная на *n*-парафинах) в воздухе рабочей зоны – 0,1 мг/м<sup>3</sup> и в атмосферном воздухе – 0,001 мг/м<sup>3</sup> (при контроле по специфическому белку). Величина ПДК клеток углеводородокисляющих дрожжей в воздухе рабочей зоны установлена  $3 \cdot 10^2$  кл/м<sup>3</sup> для дрожжей *C. tropicalis* и  $10^3$  кл/м<sup>3</sup> для дрожжей *C. maltosa*. Все углеводородокисляющие дрожжи р. *Candida* отнесены ко II классу опасности с пометкой «А» (аллерген).

Величина ПДК биологически активной добавки, представляющая собой биомассу сухих клеток цианобактерий р. *Spirulina*, установлена на уровне 6 мг/м<sup>3</sup>.

Как показали исследования, продукты биосинтеза микроорганизмов (ферменты, антибиотики) не влияют на генеративную функцию организма, не обладают канцерогенным эффектом, по токсикометрическим параметрам относятся к веществам, у которых лимитирующим показателем потенциальной опасности является сенсibiliзирующий эффект. Величина ПДК живых клеток продуцентов ферментов установлена: для *Bacillus polymyxa* (продуцент полимиксина) –  $2 \cdot 10^3$  кл/м<sup>3</sup>; для *Acremonium chrysogenum* (продуцент протеазы) –  $5 \cdot 10^3$  кл/м<sup>3</sup>. Оба продуцента отнесены к III классу опасности. Величина ПДК клеток и спор *Bacillus thuringiensis* –  $2 \cdot 10^4$  кл/м<sup>3</sup> – IV класс опасности.

### **5.3. Санитарно-гигиеническое нормирование гидролитических ферментов и других препаратов – продуктов метаболизма биологического объекта**

Для обоснования ПДК ферментных препаратов в воздухе рабочей зоны принимаются во внимание способ производства и области применения продукта, характеристика производственной среды, условия поступления вещества в воздух, его агрегатное состояние и растворимость в воде, жирах. Также учитывается способ культивирования продуцентов ферментных препаратов (глубинный или поверхностный), способ и степень чистоты выделенных ферментов, их активность, метод определения активности, наполнители, используемые при стандартизации препаратов.

Учитываются данные о безвредности штамма-продуцента, наличии в готовом продукте примесей и о возможном их вредном воз-



действию на организм, а также учитываются степень дисперсности препарата, цвет, запах и влажность.

Гидролитические экзоферменты микробиологического синтеза могут находиться в воздухе рабочей зоны в виде аэрозолей.

Для определения содержания препаратов в воздухе используются весовой метод и метод определения препарата в воздухе по его активности, аналогичный методу определения активности препарата как готового продукта.

Токсикологические исследования ферментных препаратов проводятся на лабораторных животных: белых мышах (масса тела 18–24 г), белых крысах (масса тела 180–240 г), морских свинок-альбиносах (масса тела 180–250 г) и кроликах (масса тела 1500–2000 г).

Схема токсикологических исследований по обоснованию ПДК ферментов в воздухе рабочей зоны включает:

1. Определение токсичности ( $LD_{50}$ ) при однократном введении препарата в желудок и внутрибрюшинно белым мышам.
2. Определение порога острого действия ( $Lim_{ac}$ ) при однократной ингаляции.
3. Изучение местного действия ферментных препаратов на слизистую глаза.
4. Определение порога аллергического действия  $Lim_{al}$ .

При исследовании нескольких видов одного препарата выбирается в качестве объекта для нормирования препарат, наиболее токсичный при внутрибрюшинном введении.

Токсичность препарата определяется при однократном воздействии на организм одного вида животных (белых мышей), так как исследованиями установлено, что животные не обладают видовой чувствительностью к ферментным препаратам.

Поскольку ферментные препараты при пероральном введении, как правило, малотоксичны (более 1 г/кг), изучается токсичность и характер их действия при однократном внутрибрюшинном введении с целью выбора необходимых концентраций для ингаляции при определении  $Lim_{ac}$  и  $Lim_{al}$ .

Наблюдения за состоянием животных после однократного введения ферментных препаратов осуществляются в течение 24 часов после начала опыта, так как токсическое действие проявляется, как правило, в первые сутки.

Большинство ферментных препаратов не обладают выраженными кумулятивными свойствами, поэтому исследование кумулятивного эффекта проводится только для тех ферментных препара-



тов, которые относятся к I-му классу опасности по величине LD<sub>50</sub> (табл. 5.2).

### 5.2. Классификация гидролитических ферментных препаратов микробиологического синтеза по степени опасности

Наименование показателя	Нормы для класса опасности			
	1-го	2-го	3-го	4-го
Предельно-допустимая концентрация (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, мг/м <sup>3</sup>	менее 0,1	0,1–0,5	0,6–6,0	более 6,0
Средняя смертельная доза при введении в желудок, мкг/кг	менее 1000	1000–2000	2001–5000	более 5000
Средняя смертельная доза при внутрибрюшинном введении, мкг/кг	менее 50	50–300	301–1000	более 1000
Порог однократного ингаляционного действия, мг/м <sup>3</sup>	менее 5	5–10	11–30	более 30
Порог аллергенного ингаляционного действия, мг/м <sup>3</sup>	менее 1	1–5	6–20	более 20
Порог местного раздражающего действия на слизистую глаза, %-ный раствор	менее 0,1	0,1–0,25	0,26–2,5	более 2,5

1-й класс – вещества чрезвычайно опасные, сильные аллергены, обладают сильным раздражающим действием;

2-й класс – вещества высокоопасные, аллергены средней силы, обладают раздражающим действием;

3-й класс – вещества умеренно опасные, слабые аллергены, обладают слабым раздражающим действием;

4-й класс – вещества малоопасные, слабые аллергены, обладают слабым раздражающим действием.

Установление порога острого ингаляционного действия (Lim<sub>ac</sub>) проводится с целью определения класса опасности препарата путем однократного ингаляционного воздействия на белых крыс при четырехчасовой экспозиции. Устанавливаются пороги острого общетоксического и раздражающего действия по интегральным и специфическим показателям.



Многочисленные исследования действия ферментных препаратов на кожу показали, что однократное их воздействие в концентрации 25–50% не оказывает раздражающего эффекта. Многократные аппликации на коже вызывают слабое раздражение при концентрации ферментных препаратов 2,5%, усиливающиеся с увеличением концентрации препаратов.

Поскольку наиболее чувствительной к действию ферментных препаратов является слизистая оболочка глаза, исследования местного действия ферментных препаратов проводятся при внесении их в конъюнктивальный мешок глаза. В качестве объектов исследования используют кроликов. В один глаз животного вносится ферментный препарат в виде либо порошка (до 50 мг), либо нескольких капель растворов ферментных препаратов различной концентрации. Другой глаз подопытного кролика служит контролем, в который вносится растворитель.

Действие раствора на слизистую глаза в концентрации менее 0,1% характеризует исследуемый препарат как оказывающий сильное раздражающее действие не только на слизистую оболочку глаза, но и на кожу.

Многочисленные данные токсикологических исследований ферментных препаратов (щелочной протеазы, пектиназы, целлюлазы, амилазы) показали, что ведущими факторами в развитии ими интоксикации организма являются их аллергезирующие свойства.

Порог аллергенного действия устанавливается методом ингаляционной затравки морских свинок-альбиносов в течение месяца. Выявление состояния сенсibilизации животных определяется двумя методами: внутрикожным тестированием раздражающей дозой и методом гистаминовой провокации. Животным опытной и контрольной групп вводится внутривентрально 0,03 мг/кг гистамина вместе с разрешающей дозой аллергена. Результат провокационной пробы оценивается через 5–15 минут после введения комплекса гистамин-аллерген.

На основании полученных результатов устанавливается класс опасности ферментного препарата.

При обосновании ПДК ферментных препаратов, относящихся к I-му или II-му классам опасности, в воздухе рабочей зоны по одному или нескольким показателям ( $LD_{50}$ ,  $Lim_{ac}$ ,  $Lim_{al}$ ) помимо указанных в схеме исследований, дополнительно проводится хроническая ингаляционная затравка (4 месяца) животных для определения порога хронического действия ( $Lim_{ch}$ ).



Если препарат относится к III-му или IV-му классам опасности, то их исследование ограничивается схемой, описанной выше. Изучение степени токсичности ферментных препаратов (пектиназы ГЗХ, щелочной протеазы П10Х, амилазы и др.) показало ее зависимость от активности препарата, способа культивирования продуцента и способа очистки фермента. Большинство ферментных препаратов не обладают кумулятивным эффектом при попадании в организм, сенсibiliзирующие их свойства выявляются только при внутрикожном и внутрибрюшинном введении.

Установлены величины ПДК ферментных препаратов в воздухе рабочей зоны: для протеазы –  $0,5 \text{ мг/м}^3$ , II класс опасности «А»; для триходермина –  $0,1 \text{ мг/м}^3$ , I класс опасности; для амилазы бактериальной –  $1 \text{ мг/м}^3$ , II класс опасности «А».

При исследовании антибиотиков, используемых для защиты сельскохозяйственных растений и стимуляции роста животных, выявлена разная степень их токсичности. Так, к высокотоксичным отнесены левористатин, бластицидин, к малотоксичным – бацитрацин и витамицин. Ряд антибиотиков обладают сверхкумулятивными свойствами – например, гигромицин Б, левористатин и др. Выявлено, что такие антибиотики как полимицин, гризин и др. при аэрогенном поступлении способны сенсibiliзировать организм.

Из антибиотиков, полученных методом микробного синтеза, широкое применение в сельском хозяйстве нашел бацитрацин (торговое название – бацилихин), используемый в качестве кормовой добавки. Установлена малая степень патогенности и низкая токсичность продуцента данного антибиотика *Bacillus licheniformis* и препарата, полученного на его основе. По степени токсичности бацилихин относится к малоопасным, не способным вызывать острое или хроническое воздействие.

При изучении тилозина (кормовой антибиотик) и нитрагина (бактериальное удобрение) обнаружено их общетоксическое действие.

У других препаратов (дендробациллин и др.) при санитарно-гигиенических исследованиях ведущим выявлен аллергический эффект.

Утвержденные величины ПДК на продукты микробиологического синтеза приведены в табл. 5.3.



### 5.3. Предельно допустимые концентрации (ПДК) некоторых микроорганизмов-продуцентов бактериальных препаратов и их компонентов

№№	Наименование продуцента	Назначение	В атмосферном воздухе			В воздухе рабочей зоны			
			ПДК, кл/м <sup>3</sup>	класс опасности	особое действие на организм	наименование продуцентов и продуктов	ПДК, кл/м <sup>3</sup>	класс опасности	особое действие на организм
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <sup>1)</sup>	<i>Acetobacter methylolicum</i> шт. ВСБ-924	продуцент меприна	1000	4			10000	4	
2.	<i>Acetobacter oleovorum</i> , <i>A. paraffinicum</i> шт. ВСБ-712	продуцент БВК, очистка природных экосистем от нефтепродуктов	50	3	A	<i>Acetobacter oleovorum</i> , <i>A. paraffinicum</i> шт. ВСБ-567, 568 и 712	500	3	A
3.	<i>Acetobacter</i> sp., шт. ВСБ-644	продуцент БВК	300	3					
4.	<i>Aspergillus awamori</i> шт. 120/177 и 13УД Т-2 1000J	продуцент глюкоамилазы	200	3	A		2000	3	A
5.	<i>Azotobacter vine-landii</i> , Lipman	продуцент экзополисахаридов	500	3	A		5000	3	A
6.	<i>Arthrobacter</i> sp. шт. ОС-1	продуцент препарата Дикроил	300	3			3000	3	



Продолжение таблицы 5.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7.	<i>Bacillus poluxa</i> шт. F-12	продукт β-амилазы	1000	4	A	<i>Bacillus poluxa</i> (продукт по- лимиксина M)	2000	3	A
8.	<i>Bacillus subtilis</i> шт. 72	продукт щелочной протеазы	5000	4		<i>Brevibacterium flavum</i> шт. ps-76, 10-86, 768 (продукт аминокислот)	50000	4	
9.	<i>Brevibacterium flavum</i> шт. ВКПМ-3757	продукт глута- миновой кислоты	5000	4			10000	4	
10.	<i>Corynebacterium glutamicum</i> шт. ВКПМ-13832	продукт лизина	3000	4					
11.	<i>Corynebacterium glutamicum</i> шт. ВСБ-2067	продукт амини- кислот	1000	4	A		1000	3	
12.	<i>Escherichia coli</i> шт. 1874	продукт реком- бинантного про- инсулина	выброс запрещен		A	<i>Escherichia coli</i> (продукт треонина)	1000	3	A
13.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> шт. 367-1	компонент препа- рата Деваройл	30	3			300	3	
14.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> шт. В-6844	компонент препа- рата для очистки от нефтяных за- грязнений	500	3	A		2000	3	A



Продолжение таблицы 5.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
15.	<i>Rhodococcus erythropolis</i> шт. 367-2	компонент препарата Деваройл	5000	4		<i>Pseudomonas erythropolis</i> шт.367-2, 367-6, s-1379 (продуцент биоПАВ, компо- нент препарата Деваройл)	50000	4	
16.	<i>Rhodococcus rubber</i> шт. 1418	очистка природных сред от нефтяных загрязнений	5000	4	A				
17.	<i>Penicillium canescens</i> шт. F-832	продуцент ксилаказы	200	3	A		2000	3	A
18.	<i>Trichoderma reesi</i> шт. NIBT-18.2-33; шт. 18.2/КК	продуцент целловиридина	500	3			5000	3	
19.	<i>Trichoderma viride</i> шт. 44-11-62/3	продуцент комплек- са целлюлолитиче- ских ферментов	200	3			2000	3	
20.	<i>Candida tropicalis</i> шт. ВСБ-928	продуцент кормо- вого белка	100	3	A	<i>Candida tropicalis</i> шт. ВСБ-928; ВСБ-830, 637; Арх 2/8 (продуцент кормового белка)	1000	3	A
21.	<i>Candida utilis</i> шт. ВСБ-651	продуцент эсприна	100	3	A		1000	3	A



Продолжение таблицы 5.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
22.	<i>Candida lipolytica</i> шт. 367-3	компонент препарата Деваройл	20	3			200	3	
23.	<i>Streptococcus aureo- faciens</i> шт. STR-2255	продуцент тетрацик- лина	5000	4			5000	3	
24.	<i>Streptococcus poursei</i> шт. 153/55	продуцент нистатина	500	3	A	<i>Streptococcus erythreus</i> шт. 85-1 (продуцент эрит- ромицина)	3000	3	A
25.	Препарат Деваройл на основе: <i>Rhodococcus erythropolis</i> , шт. 367-2 и шт. 367-6 <i>Rhodococcus maris</i> шт. 367-5; <i>Pseudomonas stutzeri</i> шт. 367-1; <i>Candida lipolytica</i> шт. 367-3	препарат для очистки природных экосистем от нефтяных загряз- нений	100 (по сумме микроор- ганизмов)	3			1000 (по сумме микроорга- низмов)	3	
26.	Дендробациллин (на основе <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>dendrolimus</i> )	инсектицидный препарат	5000	3	A		50000	4	A



Продолжение таблицы 5.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
27.	Колорадо (на основе <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> , шт. ВНИИГенетика 16-816)	инсектицидный препарат	500	3			5000	3	
28.						продуценты кормового белка <i>Candida maltosa</i> шт. ВСБ-542, 542В, 640, 777, 779 <i>Candida maltosa</i> шт. ВСБ-569, 778, 899, 900, 907, 930 <i>Candida scottii</i> шт. ВГИ-81/1	500  1000  1000	3  3  3	
29.	Меприн <sup>2)</sup> (бактериальный)	кормовой белок	0,01 (максимально разовая)	2	<sup>3)</sup>	Меприн (ацидофильные бактерии)	0,3 (по белку)	2	А
30.					<sup>3)</sup>	Диприн	0,3 (по белку)		А
31.					<sup>3)</sup>	Эприн	0,3 (по белку)	22	А
32.					<sup>4)</sup>	Гаприн	0,1 (по белку)	2	А
33.	Паприн <sup>5)</sup>	кормовой белок	0,001 (по спец. белку)	2		Паприн <sup>6)</sup>	0,1 (по белку)	2	А



<sup>1)</sup> 1-28 Сборник гигиенических нормативов ГН 2.1.6.2177-07; 2.2.6.2178-07, М., 2007.

<sup>2)</sup> Дополнение № 1 к списку ПДК № 3086-84 от 27.08.84.

<sup>3)</sup> Перечень № 29 «ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны» Минздрав СССР, М., 1987.

<sup>4)</sup> Дополнение № 8 к списку ПДК № 4617-88 от 01.06.93.

<sup>5)</sup> Список ПДК № 3086-84 от 27.08.84.

<sup>6)</sup> Список ПДК № 4617-88 от 26.05.88.

### **Контрольные вопросы**

1. Меры безопасности при работе с биологическими объектами.
2. Понятие «гигиенический норматив».
3. Порядок оценки безопасности промышленных штаммов.
4. Экспериментальное обоснование ПДК живых клеток в воздухе рабочей зоны.
5. Экспериментальное обоснование ПДК живых клеток в атмосферном воздухе.
6. Что такое «порог действия фактора»?
7. Основы классификации штаммов микроорганизмов по степени опасности.
8. Основы санитарно-гигиенического нормирования биотехнологических продуктов, содержащих инактивированные клетки.
9. Методы определения сенсibiliзирующих свойств «биологического фактора». Понятие «порог аллергенного воздействия».
10. Методы обоснования ПДК сухих препаратов в воздухе рабочей зоны.
11. Метод определения содержания специфического белка в выбросах биотехнологических производств.
12. Схема токсикологических исследований по обоснованию ПДК ферментных препаратов в воздухе рабочей зоны.



## **6. Инженерно-технологическое обеспечение безопасности биотехнологических производств**

Безопасность биотехнологических процессов и производств для персонала и окружающей среды обеспечивается соблюдением проектной документации при строительстве объекта и технологического регламента производства. Безопасность использования биотехнологических продуктов обеспечивается соответствием качества препаратов техническим условиям, соблюдением инструкции или технологического регламента их применения.

Биотехнологические производства используют разнообразное сырье и химикаты, выпускают широкую номенклатуру продукции в разных формах.

Ряд компонентов сырья, некоторые виды готовой продукции при попадании в атмосферу производственных помещений могут отрицательно влиять на здоровье работающих, создавать пожаро- и взрывоопасные аэрозоли, а при недостаточной очистке технологических выбросов в окружающую среду – загрязнять ландшафт на значительных расстояниях от предприятия. Вредность биотехнологических производств может определяться как химическими, так и биологическими факторами. Поэтому при проектировании биотехнологических предприятий вопросам техники безопасности, промышленной санитарии и охраны окружающей среды уделяется особое внимание.

В отношении техники безопасности разработаны отраслевые нормативы. Кроме того, на всех предприятиях обязательно составляется действующая внутри завода документация по технике безопасности – обще заводские и общепроизводственные инструкции для рабочих мест по всем стадиям и видам работ, отраженным в производственных регламентах. Регламенты обязаны содержать полные данные об отходах, технологических выбросах и стоках, конкретные рекомендации по их очистке,



обезвреживании, утилизации или уничтожению. Безусловно, в той же мере это касается всех видов основной и побочной товарной продукции, выпускаемой и реализуемой биотехнологическим предприятием.

Наиболее надежным способом обеспечения биобезопасности биотехнологических производств является организация производства с соблюдением правил асептики.

### **6.1. Асептические производства**

Асептика – это комплекс инженерно-технологических мероприятий, направленных на:

- предотвращение попадания посторонней микрофлоры в технологический процесс, что обеспечивает эффективность технологии и получение продукта требуемого качества;
- предотвращение попадания культивируемого биологического объекта с воздушными выбросами и техногенными потоками в окружающую среду.

Технологические процессы по степени асептики различают:

- асептические, полностью исключаящие попадание посторонних микроорганизмов в процесс и попадание продуцента в окружающую среду;
- условно-асептические, допускающие присутствие посторонней микрофлоры в технологическом процессе и попадание клеток биологического объекта в регламентируемых количествах в окружающую среду;
- не асептические.

Все технологии, в которых используются патогенные штаммы микроорганизмов, вирусы, культуры клеток растений и животных, а также процессы получения продуктов для медицинских целей, осуществляются в условиях асептики.

Асептические условия производства обеспечиваются специальным оборудованием и технологией. В подобных процессах проникновение в реакционный объем ферментера даже одного постороннего микроорганизма означает нарушение технологического режима и может привести к получению некондиционного продукта. А попадание клеток продуцента в окружающую среду может привести к заболеванию персонала.

Методы, применяемые для исключения попадания в процесс посторонней микрофлоры основаны на задержании или уничтожении микроорганизмов в потоках, поступающих в технологический процесс.



Предотвращение проникновения посторонней микрофлоры в процесс обеспечивается:

- стерилизацией воздуха, питательной среды и всех поступающих потоков;
- стерилизацией оборудования и коммуникаций;
- герметичностью оборудования;
- использованием специальных методов и приборов для отбора проб и контроля;
- поддержанием асептических условий в течение процесса культивирования.

К способам, основанным на принципе задержания микроорганизмов, относится *стерилизующая фильтрация*. Этот способ обеспечивает полное или частичное задержания микроорганизмов в зависимости от используемых фильтров. Способ широко применяется для очистки воздуха, поступающего на аэрацию, и жидкостей, особенно на конечных стадиях производства фармацевтических препаратов.

К способам стерилизации, основанным на уничтожении микроорганизмов, относятся термическая, химическая и радиационная стерилизация.

Выбор способа стерилизации определяется возможностью достижения заданной степени стерильности, а также экономическими факторами и сложностью используемого оборудования. В промышленности нашли широкое применение периодический и непрерывный способы стерилизации сыпучих веществ сухим (реже – острым) водяным паром.

Для стерилизации жидких сред могут применяться все вышеперечисленные методы, а также декомпрессионное воздействие, стерилизующая фильтрация, центрифугирование и электростатическое осаждение.

В наибольшей степени всем требованиям при выборе способа стерилизации отвечает метод стерилизации водяным паром, который обладает следующими преимуществами:

- легко транспортируется;
- хорошо проникает в труднодоступные места;
- обладает большой теплоотдачей при конденсации;
- не токсичен для персонала и микроорганизмов;
- относительно дешев;
- не изменяет состава питательной среды.



Существенным фактором, обеспечивающим надежную стерилизацию при тепловой обработке, является продолжительность процесса. Причем устойчивость к температуре зависит от вида микроорганизма. По сравнению с вегетативными клетками, споры бактерий устойчивее при термической обработке в сотни тысяч раз.

В связи с этим при расчетах аппаратов и установок для термической стерилизации и выбора режимов процесса ориентируются на константы гибели наиболее термоустойчивых спор бактерий *Bacillus stearothermophilus* (штамм 1518), имеющих следующие параметры: константа Аррениуса  $A_0 = 1,6 \cdot 10^{36} \cdot \text{с}^{-1}$ ; энергия активации гибели микроорганизмов  $E_r = 284,3$  кДж/моль.

Сферы применения, предосторожности и ограничения данных способов стерилизации представлены в табл. 6.1.

Наиболее эффективными способами термической стерилизации являются автоклавирование для малогабаритных аппаратов и обработка крупногабаритных аппаратов и трубопроводов острым паром под давлением не менее 0,3 МПа (3 кгс/см<sup>2</sup>).

Для стерилизации отдельных блоков аппаратов, датчиков измерительных приборов и регуляторов, не выдерживающих высокотемпературной паровой стерилизации, применяется химическая стерилизация. В качестве агентов химической стерилизации используют формальдегид, оксид этилена, перекись водорода, щелочи, спирты, кислоты,  $\beta$ -пропиолактон.

Для обеззараживания жидкостных потоков в отдельных случаях также применяются химические стерилизующие агенты (вещества, обладающие асептическим действием). Основная проблема в этом случае – устранение стерилизующего агента из питательной среды после инактивации микрофлоры перед внесением в среду посевного материала. Химические агенты должны быть не только высокоэффективны, но и легко разлагаться при изменении условий после завершения стерилизации. К числу лучших химических стерилизующих агентов относится  $\beta$ -пропиолактон, обладающий сильным биоцидным действием и легко гидролизуемый в молочную кислоту.

К физическим методам стерилизации относится радиационная стерилизация, гибель живых клеток микроорганизмов за счет ионизирующего излучения. В силу ряда причин (в том числе из-за необходимости приобретения и эксплуатации мощных источников излучения) этот способ не нашел широкого применения в биотехнологии.

Для стерилизации небольших потоков технологической воды в ряде процессов используется ультрафиолетовое облучение.



### 6.1. Характеристика способов стерилизации

Метод	Процедура	Сфера применения	Предосторожности	Ограничения
1	2	3	4	5
Сухой жар	Прямое действие сухого жара +190 °С (80 мин) или +160 °С (130–160 мин)	Стеклянные лабораторные принадлежности и изделия из металла	Высокая температура может повредить изделия из тонкого проката или тонкой проволоки	Ограничения по материалу: высокотемпературная экспозиция может привести к нежелательным изменениям свойств материала
Автоклавирование (перегретый пар под давлением)	Три действующих компонента: температура, водяной пар и давление. +121 °С (15 мин) или +126 °С (10 мин)	Стекло, ткани жидкости при условии устойчивости компонентов к высокой температуре, не ниже +121 °С	Не рекомендуется для стерилизации большинства обычных пластиков	Необходимость обеспечения свободного оттока воздуха из изделий до начала стерилизации; обычно применяется для мелких изделий
Газовая (этиленоксид)	Используется индивидуально, а также в смеси с фреоном или карбондиоксидом +55–60 °С (2–3 ч) или +27–33 °С (5 ч 30 мин)	Практически любые материалы за редким исключением	Требуется постстерилизационная вентиляция для удаления остатков газа, которые могут быть токсичными	Этиленоксид – газ токсичный и взрывоопасный; процедура стерилизации не экономична
Гамма-радиация (радиоактивный источник – кобальт)	Радиация, излучаемая соответствующим источником частиц	Широко применяется для стерилизации одноразовых изделий; радиационная доза рассчитывается исходя из радиационной бионагрузки	Свойства некоторых материалов могут изменяться под влиянием гамма-радиации нежелательным образом	Нежелательное воздействие на свойства материалов имеет кумулятивный эффект и повторная стерилизация после использования не допускается



Продолжение таблицы 6.1

1	2	3	4	5
Бета-радиация (ускоритель частиц)	Электронный поток высокой энергии	-«-	-«-	-«-
Химическая (формальдегид)	Вещество в виде паров	Минимально используется в промышленности	Токсичен	Требует специального оборудования

Метод ультрафильтрации является идеальным для стерилизации термически неустойчивых жидких и газовых потоков, поскольку может осуществляться при низкой температуре и требует лишь градиента давления по разные стороны мембраны. Реализация данного способа зависит от наличия термостойких мембран, выдерживающих многократную стерилизацию.

Наиболее широко в биотехнологии применяются методы тепловой стерилизации. В зависимости от способов культивирования биообъекта или специфики получаемых продуктов биосинтеза тепловая стерилизация осуществляется периодическим или непрерывным способом.

При *периодической* стерилизации процессы нагревания, выдержки и охлаждения среды протекают последовательно во времени в одном аппарате. Это может быть ферментер, посевной аппарат, или специальный стерилизатор. Весь объем среды нагревают в аппарате до заданной температуры, выдерживают при этой температуре строго определенное время и охлаждают водой, подаваемой в рубашку аппарата или змеевик. Метод отличается простотой и надежностью, но имеет свои недостатки: ухудшается качество питательной среды из-за длительного воздействия высокой температуры (возможна карамелизация глюкозы, разрушение витаминов и др.); требуется повышенный расход пара для нагревания среды; периодический процесс труднее поддается автоматизации.

При *непрерывном* способе стерилизации каждый процесс – нагревание, выдержка и охлаждение – осуществляется в отдельном аппарате, которые последовательно соединены между собой. Установка непрерывной стерилизации (рис. 6.1) состоит из нагревателя, выдерживателя и холодильника (рекуператора тепла). В такой системе можно применять более высокие температуры, чем те, которые считаются экономичными при периодическом способе стерилизации. В результате продолжительность выдерживания среды при максимальной температуре резко сокращается, а периоды нагревания и охлаждения не превышают нескольких секунд.



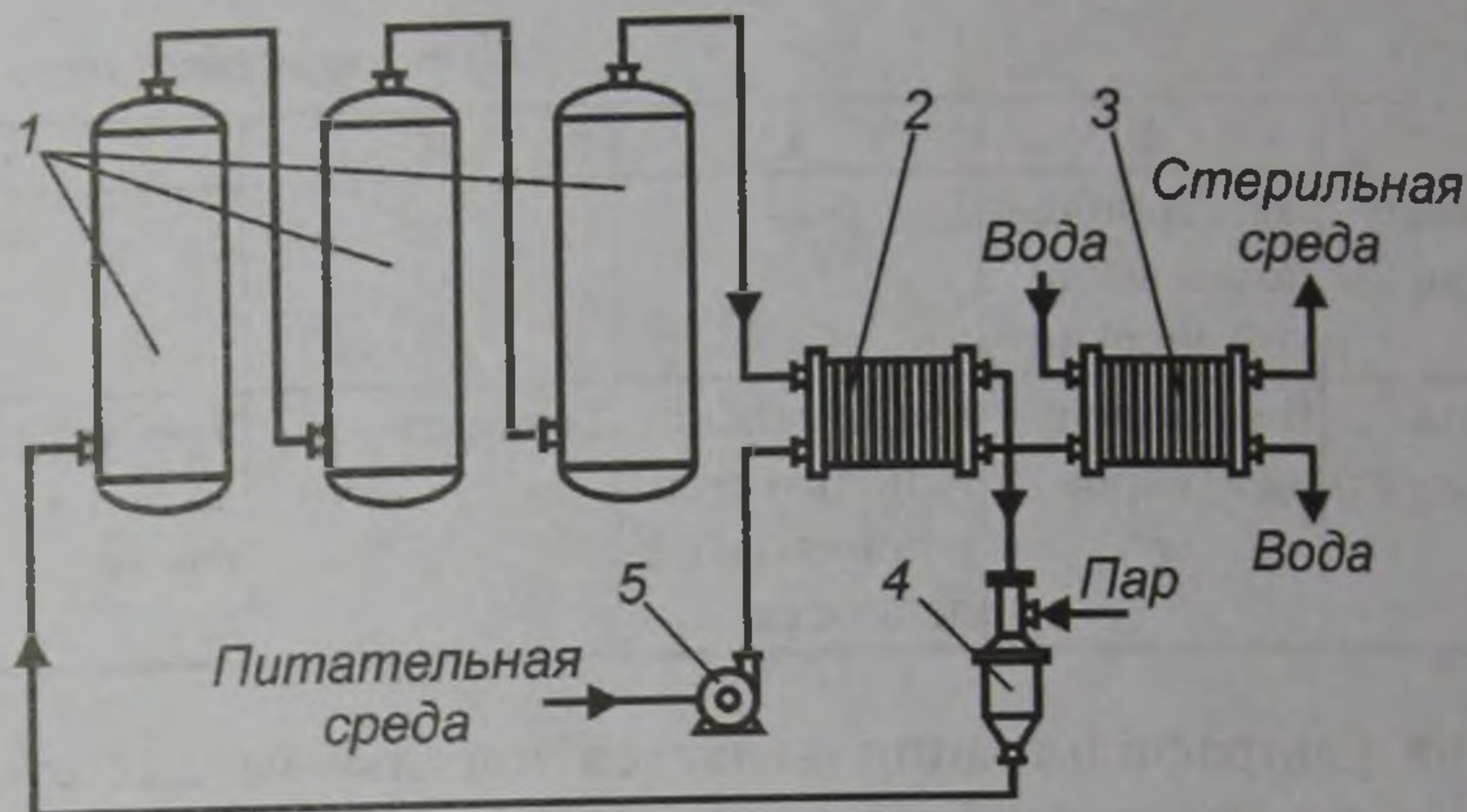


Рис. 6.1. Установка непрерывной стерилизации (УНС) питательной среды:

1 – секции выдерживания стерилизатора; 2 – рекуператор тепла; 3 – теплообменник; 4 – нагревательная колонна; 5 – насос

Стерилизация жидких сред чаще всего проводится в непрерывном режиме с использованием установки непрерывной стерилизации.

Основными элементами установки являются: нагреватель и выдерживатель.

*Нагреватель* обычно представляет собой колонну и предназначен для непрерывного и быстрого (за несколько секунд) нагревания питательной среды острым паром. В этом случае достигаются оптимальные условия стерилизации.

*Выдерживатель* предназначен для обеспечения равного времени пребывания каждого элементарного объема среды в аппарате. Этому соответствует аппарат идеального вытеснения. Для приближения к такому режиму работы в зоне входа жидкости в аппарат устанавливают различные распределительные устройства. Сам аппарат представляет собой выдерживатель трубчатого типа, состоящий из вертикальных труб диаметром 0,4–0,6 м и длиной 6–8 м. Для поддержания температуры стерилизации трубы либо покрывают изоляцией, либо подают в «рубашку» пар.

Одним из важнейших требований к *холодильникам и рекуператорам* является сохранение достигнутой стерильности среды. Поэтому используются пластинчатые теплообменники а в последнее время – и охладители мгновенного охлаждения (быстродействующие испарители).

Сыпучие среды, используемые для получения кормовых добавок и ферментов поверхностным способом, стерилизуются паром или инфракрасными лучами.



Наиболее часто для стерилизации аппаратуры и трубопроводов применяется тепловая обработка насыщенным паром.

Важнейшим условием эффективности стерилизации оборудования является создание во всех точках внутренних полостей необходимой температуры и поддержание ее в течение заданного времени.

Трудности выполнения этого условия связаны с наличием многочисленных тупиковых полостей, выступов и неравномерной интенсивности теплоотдачи в окружающую среду.

В процессе тепловой обработки внутренних полостей аппаратов происходит конденсация пара у стенки с образованием пленки, под которой образуется слой воздуха – «воздушный барьер», резко снижающий коэффициент теплоотдачи от пара к стенке. В особо неблагоприятных условиях находятся такие элементы обвязки ферментера, как кольцевые зазоры в местах ввода датчиков КИП, тупиковые штуцеры, торцевые уплотнения и т. п. Заметное количество воздуха, скапливающееся в них, вызывает снижение эффективности стерилизации. Кроме того, за счет теплопроводности стенок штуцеров температура в них падает быстрее, чем в основном объеме аппарата. Все это вынуждает увеличивать продолжительность обработки аппарата для достижения требуемого критерия чистоты в наиболее трудностерилизуемых местах.

Анализ схем обвязки ферментеров показывает, что они состоят из одинаковых типовых элементов. Для предотвращения проникновения посторонней микрофлоры все материальные линии аппаратов должны быть оснащены термическими затворами, в которые постоянно подается пар и удаляется в канализацию образующаяся пароконденсатная смесь.

Другими опасными местами являются тупиковые полости, которые образуются в местах ввода в аппарат различных встроенных элементов – змеевиков, барботеров, труб передавливания и т. п., а также тупиковые полости на трубопроводах, часто возникающие за счет ошибочных конструктивных решений.

Расчетным путем можно показать, что для достижения равной степени стерилизации в перечисленных «слабых» точках и в объеме ферментера продолжительность выдерживания различается примерно в 100 раз, если принять температуру пара в них 100 °С.

Наиболее действенной мерой повышения эффективности стерилизации оборудования и коммуникаций является ликвидация «слабых» точек. Способы их устранения зависят от конструктивных особенностей конкретного элемента. Например, стерилизуемость тупиковых полостей может быть повышена либо уменьшением длины полости (штуцера), либо принудительной подачей в нее пара.



Второй процесс, определяющий конструктивные особенности аппаратуры, – ее герметизация. Герметизация решает две задачи: защиту внутреннего объема от посторонней микрофлоры и защиту окружающей среды от биообъектов и продуктов биосинтеза.

Проблема обеспечения герметичности усложняется рядом причин: резким различием параметров проведения разных стадий технологического процесса (например, стерилизации и культивирования), вибрацией аппаратуры при работе перемешивающих устройств, крутящими моментами за счет разницы температур, различной степенью затяжки болтовых соединений и т. п.

Большинство случаев разгерметизации приходится на арматуру, в которой наиболее опасные места – это уплотнение соединения седло-клапан, уплотнения на фланцевых соединениях, уплотнения валов мешалок и места ввода датчиков КИП в аппараты.

В целях повышения эффективности герметизации осуществляется переход на сварные соединения вместо фланцевых, на сильфонные или мембранные вентили вместо обычных, на создание торцевых уплотнений для валов перемешивающих устройств с контролируемой герметичностью.

Наиболее трудно стерилизуемыми в аппаратах являются тупиковые зоны, места ввода различных встроенных элементов (змеевиков, барботеров и др.), датчиков КИП, разводных трубопроводов, места их присоединения к аппарату, а на трубопроводах – места между штуцером и участком трубы до вентиля.

Для предотвращения попадания посторонней микрофлоры все материальные линии аппаратов должны быть оснащены термическими затворами, через которые постоянно подается пар и удаляется в канализацию образующаяся пароконденсатная смесь.

Термический затвор стерилизуется одновременно с аппаратом. При этом пар подается через полностью открытые вентили на линии пара и на трубопроводе, а вентиль на линии конденсата приоткрывают так, чтобы в стерилизуемой линии обеспечивалось требуемое давление.

Повышение эффективности стерилизации оборудования и коммуникаций связано с конструктивным совершенствованием аппарата и конкретных элементов.

Одним из важнейших этапов биологических процессов является *получение инокулята* – посевного материала. Технологическая стадия получения инокулята представляет последовательное размножение чистой культуры (или ассоциативной культуры определенного состава) на питательных средах увеличивающегося объема для получения необходимого количества материала, которым засеивается используемый ферментер.



Подготовка инокулята осуществляется сначала в лабораторных условиях (хранение чистой культуры и первый этап культивирования музейных культур), а затем в посевных аппаратах увеличивающегося объема. Объем используемых при этом аппаратов определяется объемом промышленного аппарата.

Чистота инокулята обеспечивается соблюдением техники микробиологических работ и необходимых санитарно-гигиенических условий в помещениях, где проводятся работы.

При накоплении биомассы посевного материала в требуемых количествах инокулят передавливает стерильным сжатым воздухом по посевному коллектору в промышленный аппарат.

Для обеспечения безопасности персонала и жителей сельтебных зон на выходе из аппарата отработанного воздуха, содержащего аэрозоль с клетками микроорганизмов, устанавливается термический затвор, в котором инактивируются живые клетки.

Эффективность процессов термической стерилизации характеризуют следующие показатели:

$\tau_c$  – время термической гибели, необходимое для уничтожения всех микроорганизмов данной популяции, мин;

$\tau_{10}$  – время, в течение которого концентрация микроорганизмов снижается в 10 раз, мин;

$k$  – удельная скорость гибели микроорганизмов,  $\text{мин}^{-1}$ ;

$\Delta$  – фактор инаktivации, определяемый как десятичный логарифм отношения количества спор до ( $N_0$ ) и после ( $N$ ) стерилизации, кл/мл:

$$\Delta = \lg(N_0/N).$$

Важным технологическим процессом является *подготовка воздуха*, состоящая из его очистки от механических включений и стерилизации.

Воздух в микробиологических процессах в значительных количествах используется для аэрации при глубинном культивировании аэробных микроорганизмов. Воздух, подаваемый в ферментер, не только снабжает растущую культуру кислородом, но и отводит газообразные продукты обмена и тепло, выделяемое микроорганизмами в процессе развития, обеспечивает однородность микробной суспензии, увеличивает скорость массопередачи и перемешивания жидкой питательной среды.

Воздух также используется для вентиляции цехов и боксов, передачи под давлением стерильных культуральных жидкостей и растворов, поддержания избыточного давления в стерильных емкостях.



Отработанный воздух, отводимый от технологического процесса и из лабораторных и производственных помещений, также должен подвергаться очистке от клеток биообъекта.

Высокая степень очистки воздуха от микроорганизмов обеспечивается использованием методов фильтрации через волокнистые (бумага, картон), пористые (полимерные пленки, металлы, керамика) или зернистые материалы с последовательно расположенными фильтрующими элементами. Фильтрующий материал (при возможности) стерилизуется через заданные промежутки времени подачей острого пара в отключенный фильтр.

Эффективность стерилизации воздуха любым методом оценивается по величине коэффициента проскока:

$$K_{\text{пр}} = \frac{N}{N_0} \cdot 100\%.$$

Для любых фильтров коэффициентом проскока называется отношение концентрации монодисперсного загрязнителя на выходе из фильтрующего блока к исходной.

Кроме того, систему фильтрации в целом можно характеризовать гидравлическим сопротивлением фильтрующего блока ( $\Delta P = P_0 - P$ ), микробиологической надежностью (вероятность удельного проскока первой жизнеспособной клетки) и суммарным перепадом давления в системе.

Обычно используемые в биотехнологии фильтрующие системы имеют коэффициент проскока  $K_{\text{пр}}$  от  $10^{-8}$  до  $10^{-10}\%$ , что вполне обеспечивает требования стерильности промышленного производства. Вероятность проскока хотя бы одной клетки  $N \approx 10^{-5} - 10^{-8}$ .

При выборе диаметра волокон ( $d_v$ ) обычно руководствуются правилом, что  $d_v$  должен быть одного порядка с  $d_r$ . На практике при среднем диаметре частиц 0,5–1,0 мкм используются волокна диаметром 1,0–16 мкм.

С уменьшением диаметра волокна уменьшается и толщина слоя насадки ( $H$ ), причем  $H \sim d_v^{2,0-2,5}$ . Наиболее часто используются фильтрующие материалы на основе ткани Петрянова, представляющей собой полотно из синтетической ткани с различным диаметром волокон:

- ФПП-15 ( $d_v = 1,5$  мкм) – из перхлорвинила;
- ФПП-25 ( $d_v = 2,5$  мкм) – из перхлорвинила;
- ФПС-15 ( $d_v = 1,5$  мкм) – из полистирола;
- ФПФС-15 ( $d_v = 1,5$  мкм) – из полифторстирола, выдерживающие нагрев до 150 °С, что позволяет проводить стерилизацию острым паром;



– ФПА-15 ( $d_b = 1,5$  мкм) – из ацетатцеллюлозы, которую также можно стерилизовать острым паром.

Основные характеристики фильтров тонкой очистки приведены в табл. 6.2.

### 6.2. Характеристики фильтров тонкой очистки

Материал, характеристика	Масса, 1 м <sup>2</sup> , кг	Данные для 1 слоя материала при скорости воздуха 0,01 м/с	
		сопротивление, Па	эффект улав- ливания в масляном тумане
Волокнистые материалы, картон, бумага			
Базальтовое супертонкое волокно БСТВ, $d_b = 1$ мкм	–	110	99,32
Микротонкое базальтовое волокно:			
$d_b = 0,7$ мкм	–	184	99,99
$d_b = 0,4$ мкм	–	336	99,995
Синтетическое волокно:			
ФПП-15, $d_b = 1,3–1,7$ мкм	0,025	15	93,44
ФПА-15, $d_b = 1,5$ мкм	0,03	9	90,1
Картон на основе БСТВ с добавкой 10% целлюлозы	0,03	61	99,93
Бумага на основе БСТВ с добавками:			
25% целлюлозы	0,025	40	99,83
10% целлюлозы и 10% латекса	0,1	92	99,7
Пористые материалы			
Фторопласт без наполнителя	4,37	250	99,999
Поливиниловый спирт (фир- ма «Марубиси», Япония)	1,07	139	99,9
Мембранные фильтры			
Мембранный фильтр, ГОСТ 8985-59	–	4000	99,995
Ультипор АВ (фирма «Палл», ФРГ)	–	–	99,999

Для гарантированного обеспечения стерилизации воздуха важен режим стерилизации самой системы, и в первую очередь фильтрующих материалов, что зависит от вида, толщины материала и продолжительности стерилизации.



Наиболее современными конструкциями являются фильтры кассетного и патронного типа в зависимости от типа фильтрующего материала.

Конструкции аппаратов должны обеспечивать два главных требования:

- максимальную перпендикулярность движения газа к поверхности насадки;
- движение газа *только* через слой фильтрующего материала.

Для того, чтобы газ не проникал в зазор между корпусом и насадкой, величина зазора должна быть одного порядка с зазором между волокнами. Поэтому обычной установкой вырезанных матов или листов на опорную решетку достичь такого уплотнения не удастся. В таких случаях для волокнистых материалов большой толщины или непрочных используют фланцевые конструкции; для тонких и гибких материалов – патронные. Переток воздуха через зазоры устраняют герметизацией краев насадки или зажатием их между фланцами.

Эффективность работы системы очистки и стерилизации воздуха складывается из ряда факторов, к которым относится и правильный выбор фильтрующего материала, зависящий от требуемой степени очистки и размера проникающих частиц аэрозоля.

Важным технологическим свойством фильтрующего материала является высокая эффективность очистки при минимальном сопротивлении.

Условно-асептические процессы осуществляют:

- при твердофазном культивировании биообъекта с целью получения биомассы, используемой для кормовых целей, для получения препарата для биоремедиации загрязненных природных сред, для получения антибиотиков;
- при глубинном культивировании биообъекта на субстратах, являющихся антисептиками, например, на метаноле, уксусной или молочной кислоте;
- при культивировании биообъекта в условиях, не являющихся оптимальными для развития инфицирующей микрофлоры (рН 4,0–4,5; рН 8–11; слишком низкая или слишком высокая температура и др.).

В технологиях условно-асептических процессов проводится частичная стерилизация потоков, поступающих на стадию культивирования. Как правило, это тепловая стерилизация исходной питательной среды и соблюдение всех мероприятий, направленных на получение чистой культуры – инокулята, а также на создание условий культиви-



рования, благоприятствующих росту промышленного штамма. Подаваемый воздух, как правило, в этих процессах не стерилизуется.

## **6.2. Системы очистки газоздушных выбросов биотехнологических производств**

Технологические потоки выбросов разных биотехнологических предприятий значительно различаются по своим физико-химическим свойствам и содержанию в них «биологического фактора». Исходя из этого, при создании технических систем локализации выбросов учитывают:

- физико-химические свойства потоков (температуру, влажность, рН, удельный вес и др.);
- количественную и качественную характеристику биологически активных частиц (фракционно-дисперсный состав, устойчивость и др.).

Основные газоздушные выбросы (ГВВ) биотехнологических производств представляют собой аэрозоли, нестабильные дисперсные системы, состоящие из мелких твердых частиц (клеток, их агрегатов) в жидкой фазе, взвешенные в газовой среде.

Все организованные источники ГВВ от ферментеров, сепараторов, флотаторов, центрифуг, сушилки, упаковочного отделения и другого технологического оборудования оснащаются системами очистки, неразрывно связанными с технологическими особенностями отдельных стадий процесса.

Наиболее распространенными, апробированными методами очистки ГВВ от биологически активных частиц являются фильтрация, тепловая обработка и «мокрые» системы очистки.

По своему составу основная масса ГВВ условно может быть разделена на 2 группы:

- ГВВ, содержащие живые клетки микроорганизмов, капли культуральной жидкости с продуктами метаболизма и пену;
- ГВВ, содержащие сухие клетки микроорганизмов (белковую пыль) или мелкие частички целевого продукта.

Очистка ГВВ первой группы предусматривает наличие специального сепаратора для отделения капель и пены с последующей очисткой от клеток микроорганизмов в скруббере Вентури на 99,99%.

Очистка ГВВ второй группы, где основным компонентом является белковая пыль, содержание которой достигает 200–300 мг/м<sup>3</sup>, предусматривает использование в технологической схеме двухза-



ходного скруббера Вентури для обеспечения эффективной очистки до значения ПДК.

При очистке газовых выбросов основной задачей является разрушение аэрозоля. Время разрушения аэрозолей определяется скоростью седиментации (осаждения) дисперсных частиц или скоростью их коагуляции (укрупнения за счет объединения частиц).

Большинство методов борьбы с аэрозолями основано на интенсификации процессов слияния жидких частиц. Для этого часто используют пористые керамические или металлические элементы.

На первой ступени очистки газоздушных выбросов от ферментеров в начале отводящей трубы применяются фильтры, заполненные металлическими стружками (туманоуловители) или керамическими кольцами Рашига, на которых происходит частичное укрупнение капель аэрозоля и возвращение их на стадию ферментации.

На стадиях ферментации и сепарации основные системы очистки отходящего воздуха от клеток микроорганизмов представляют собой скрубберы Вентури с каплеотделителем или двухступенчатую систему, состоящую из скруббера Вентури и сетчатого туманоуловителя.

Нержавеющая сетка трикотажного плетения туманоуловителя расположена перпендикулярно движению газоздушного потока. Мелкие капли аэрозоля, содержащие клетки промышленного штамма, сталкиваясь с сеткой, укрупняются и стекают в нижнюю часть аппарата. Стабильность и эффективность работы установки с туманоуловителем достигается за счет непрерывной регенерации сетки туманоуловителя без остановки основного технологического процесса.

При соблюдении технологического режима, в частности, качества и количества орошающей воды, перепада давления по газовой фазе, при мокрой очистке снижается концентрация микробосодержащих частиц в технологических газах, отходящих от ферментеров (при культивировании дрожжей) в среднем на 4–5 порядков, обеспечивая уровень ниже  $10^2$  кл/м<sup>3</sup>, т. е. ниже ПДК клеток в воздухе рабочей зоны. Зона распространения клеток в основном ограничена расстоянием 150–200 м от источника выброса. Эффективность такой системы очистки составляет 99,9%.

В биотехнологической промышленности широко используется *распылительная сушка*. Распылительные сушилки представляют собой вертикальный цилиндрический аппарат с коническим днищем. Исходная суспензия или раствор с помощью распылительного устройства диспергируются на мелкие капли диаметром 10–100 мкм, что приводит к развитию межфазной поверхности и интенсивности испарения влаги в потоке нагретого сушильного агента (100–150 °С).



Время пребывания материала в сушилке – 15–20 с. При этом материал нагревается до температуры 40–60 °С (не выше температуры мокрого термометра). На днище аппарата оседает 70–80% высушенных частиц, которые отводятся шнеком или с помощью пневмотранспорта на упаковку. Другая часть более мелких частиц выносятся из аппарата сушильным агентом и улавливается системой газоочищающих установок (ГОУ).

Для получения продуктов, в которых после высушивания требуется сохранить жизнеспособность микроорганизмов и высокую биологическую активность (хлебопекарские дрожжи, аминокислоты, антибиотики, ферменты и др.) используются более мягкие условия сушки при температуре 40–50 °С. Поскольку при этих условиях снижается интенсивность испарения влаги, то процесс сушки часто проводят под вакуумом.

Для обеспечения стерильности высушиваемых продуктов сушильный агент (обычно – воздух) перед подачей в сушильную камеру подвергают очистке, например, стерилизующей фильтрацией.

Для получения продуктов, которые не требуют сохранения жизнеспособности микроорганизмов или обеспечения их высокой биологической активности используются более жесткие, интенсивные режимы сушки.

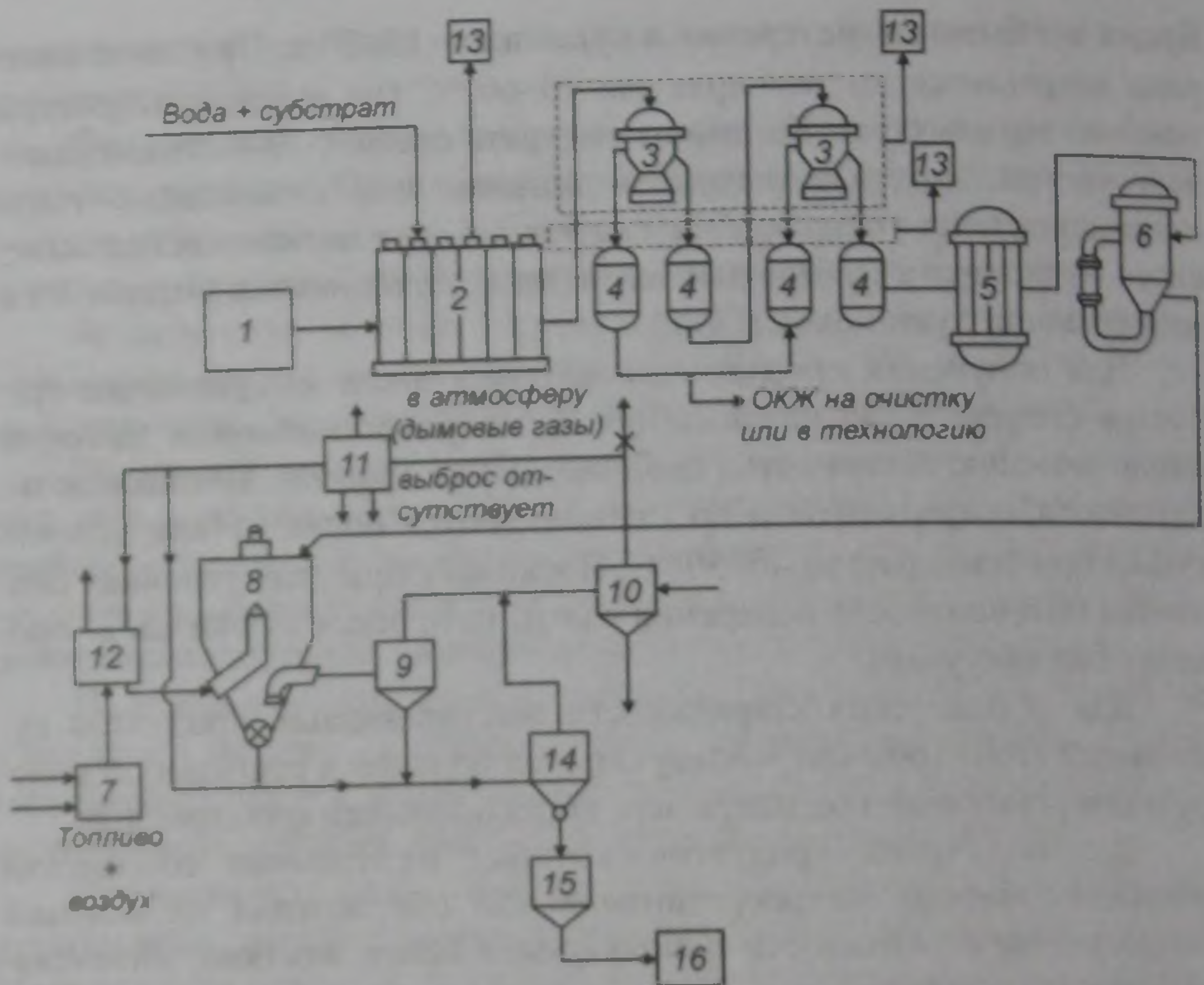
Для очистки газовоздушных потоков сушильных установок используются разные технологические решения, зависящие от схемы процессов сушки. Используется и замкнутый контур циркуляции теплоносителя и воздуха пневмотранспорта.

Очистка газовоздушных выбросов после распылительных сушилок производится также в две ступени: первая – «сухая» очистка в циклонах; вторая – в скрубберах Вентури. Общая эффективность такой системы составляет в среднем 99,5%.

Для исключения попадания готового продукта в атмосферный воздух разработано несколько технологических схем процесса сушки. В частности, разработана сушильная установка, в которую входит конденсатор для вывода испаряемой влаги. Это позволяет полностью замкнуть контур циркуляции по схеме: воздухоподогреватель – сушильная камера – циклонная группа – аппарат «мокрой» очистки – конденсатор – воздухоподогреватель (рис. 6.2). В этом случае в атмосферу выбрасывается лишь часть отработанных топочных газов после воздухоподогревателя, не имеющих контакта с пылью высушиваемого продукта.

Такая система очистки позволяет полностью исключить попадание сухих частиц биообъекта в атмосферный воздух.





**Рис. 6.2.** Технологическая схема с использованием замкнутого контура циркуляции отработанного воздуха:

1 – аппарат для приготовления чистой культуры; 2 – ферментер; 3 – сепараторы I и II ступеней; 4 – сборники дрожжевой суспензии; 5 – плазмоллизатор; 6 – выпарной аппарат; 7 – топка; 8 – сушильная камера; 9 – циклонная группа; 10 – аппарат мокрой очистки; 11 – конденсатор; 12 – воздухоподогреватель; 13 – газоочистные установки; 14 – циклон-разгрузитель; 15 – бункер-накопитель; 16 – упаковочная машина

### 6.3. Системы очистки сточных вод биотехнологических производств

Все жидкостные стоки производства могут быть разделены на потоки основного производства и вспомогательного производства.

К сточным водам основного производства относятся прежде всего отработанная культуральная жидкость, образующаяся при отделении биомассы от жидкой фазы, которая составляет 80% от общего объема стоков производства. К этой группе относятся также потоки орошающей воды системы газоочистки, скрубберов Вентури, промывные воды со стадии сепарации, вода от промывки оборудования, вода из охлаждающих систем.



Стоки вспомогательного производства после очистки могут использоваться для подпитки оборотных охлаждающих систем водоснабжения в производстве, а также для компенсации потерь воды при испарении и капельном уносе на градирнях.

Для обработки контаминированных микроорганизмами промышленных стоков используются химические и физические методы, а также их комбинации.

*Химические методы* основаны на введении в стоки соответствующего химического реагента в определенной концентрации при оптимальных условиях окружающей среды: температуре, массопереносе, величине рН и длительности экспозиции др. Установлено, что химические методы инактивации даже вегетативных форм микроорганизмов требуют значительных концентраций химического реагента в обрабатываемой среде на всем протяжении процесса, адекватного смешивания его со стоками, повышенных температур и длительных экспозиций.

После завершения обработки стоков химическими реагентами, перед сбросом их в канализацию и направлением на биологическую очистку, непрореагировавший избыток химического агента следует нейтрализовать для сохранения необходимой активности микрофлоры биофильтров или активного ила.

Все это делает химическую обработку крайне ненадежной и неэкономичной, поэтому она не находит применения в микробиологических производствах.

Из физических методов могут использоваться: ионизирующая радиация; ультрафиолетовое излучение; воздействие ультразвуком; обратный осмос и ультрафильтрация; термическая паровая обработка.

*Термическая паровая деконтаминация* стоков может осуществляться в системах, работающих по циклическому или непрерывно-проточному принципам.

Количество аппаратов ( $n$ ) определенной емкости определяется по уравнению:

$$n = \frac{Q \cdot \tau}{24 \cdot Y \cdot K_3},$$

где  $Q$  – суточное количество стоков, м<sup>3</sup>;  $Y$  – полная емкость аппарата для сбора стоков и их термообработки;  $K_3$  – коэффициент заполнения аппарата (для процессов без вспенивания – 0,7–0,85, со вспениванием – 0,4–0,6);  $\tau$  – продолжительность одного цикла, включая операции осмотра и подготовки аппарата, приема стоков, нагрев их до температуры обработки, выдерживания, охлаждения и сброса в канализацию, ч.



Типичный режим паровой обработки предусматривает нагревание до 128 °С, выдерживание в течение 30 мин (иногда до 1 часа) и охлаждение до 40 °С.

Недостатком работы аппаратов циклического действия является их относительно низкая производительность.

Более широко используется непрерывно-поточный метод, рассчитанный на быстрое нагревание жидкостей в непрерывном потоке до температуры обезвреживания, выдерживание в течение секунд или минут и быстрое охлаждение.

При работе в установившемся режиме стоки из сборника подаются насосом в рекуператор, где они подвергаются предварительному нагреванию путем теплообмена с горячими стоками, отходящими из установки после выдерживания при температуре обработки, и поступают далее в паровой нагреватель. Нагретые в нем до температуры деконтаминации стоки проходят через выдерживатель, далее – через рекуператор и охладитель, после чего подаются на биологическую очистку. Указатель температуры на выходе из выдерживателя блокируется вентилями так, что если температура ниже требуемой для деконтаминации, то стоки по рециркуляционному контуру возвращаются в сборник стоков, а не сбрасываются.

Общепринятыми методами очистки стоков промышленных предприятий, в том числе и биотехнологических, являются биологические, основанные на способности микроорганизмов использовать в качестве источника питания загрязнения сточных вод.

Наибольшей технической сложностью при очистке сточных вод предприятий по производству биомассы микроорганизмов является их освобождение от биогенных элементов – азота, фосфора и анионов сильных кислот (сульфатов и хлоридов), входящих в состав питательной среды при культивировании биообъекта. По оценке экспертов, затраты на очистку сточной воды могут достигать 30–40% стоимости предприятия.

Исходя из этого, очевидно, что повышение эффективности очистки жидкостных потоков биотехнологических производств связано с совершенствованием основного технологического процесса. Одним из таких подходов является повторное использование отработанной культуральной жидкости на стадии культивирования, что приводит к снижению общего расхода водопотребления в производстве, сырья (элементов минерального питания) и потока, поступающего на стадию биологической очистки. Однако объем возвращаемой культуральной жидкости ограничен – не более 70% – вследствие накопления в среде культивирования продуктов метаболизма.



Принципиальным решением этой проблемы является разработка процесса получения биомассы микроорганизмов при замкнутом цикле водоиспользования. Реализация такой технологии требует регулирования состава питательной среды, особенно регулирования подачи в ферментер биогенных элементов.

При замкнутом цикле водоиспользования стадия биологической очистки сточных вод рассматривается как вторая стадия ферментации. Разрабатываются режимы подачи элементов минерального питания, очистки стоков, возврата очищенных жидкостных потоков на стадию ферментации в условиях единой технологической системы. Реализация замкнутой системы водоиспользования на заводе по получению кормовых дрожжей из *n*-парафинов позволила полностью исключить сброс сточных вод в природный водоем, сократить расход свежей воды на технологические нужды со 130–160 м<sup>3</sup> на 1 т продукта до 14 м<sup>3</sup>/т.

Для обеспечения экологически чистого производства биомассы микроорганизмов необходимо:

- приготовление питательной среды с использованием солей, предотвращающих образование шламов (например, жидкого аммоний-фосфата) с целью исключения твердых отходов;
- исключение сброса промышленных сточных вод за счет возврата в производственный процесс отработанной культуральной жидкости или биологически очищенной воды;
- использование сушильных и грануляционных установок с замкнутым контуром циркуляции теплоносителя для устранения попадания пыли готового продукта в атмосферный воздух;
- исключение пыления при погрузочно-разгрузочных работах на транспорте и у потребителя за счет выпуска гранулированного продукта.

#### **6.4. Деконтаминация воздуха и производственных поверхностей**

Для стерилизации производственных поверхностей на практике используют средства и приемы дезинфекции, известные в санитарии уже многие десятилетия.

Основные средства – это жидкие дезинфицирующие препараты (сулема, карболовая кислота, формалин, каустическая сода и т. д.).

Основные методы – это обмывание, орошение, протирание смоченной ветошью и т. д.



Недостатками этих методов являются:

- сильное коррозирующее действие используемых средств, а также возможность проявления признаков аллергии у обслуживающего персонала;
- применяемые методы связаны с большим расходом растворов, значительными затруднениями при обработке стен и потолков, требуют ручного труда, больших затрат времени; при этом отсутствует гарантия уничтожения микрофлоры в труднодоступных местах.

Для стерилизации воздуха может использоваться любой стерилизующий агент, способный вызывать гибель микроорганизмов. На практике выбор сводится к ультрафиолетовому облучению и (или) к использованию химических реагентов в газообразном или аэрозольном состояниях.

Эффективность стерилизации УФ лучами зависит от интенсивности и продолжительности облучения (от дозы), наличия в воздухе паров воды, расстояния от лампы до облучаемого объекта, от конвекции обрабатываемого воздуха в помещении.

Экспериментально установлено, что для достижения 70%-ного снижения микробной зараженности воздуха необходимо использовать светильники, излучающие не менее  $4-5 \text{ Вт}\cdot\text{ч}/\text{м}^3$ . В зависимости от вида микроорганизмов доза может быть увеличена до  $50 \text{ Вт}\cdot\text{ч}/\text{м}^3$ .

К недостаткам УФ деконтаминации следует отнести: высокую стоимость и громоздкость оборудования; возможное повреждение изделий из пластмассы (помутнение), вредное влияние УФ облучения на организм человека.

Для успешного проведения стерилизации химическими способами реагент должен быть либо в газообразной форме, либо в виде аэрозоля.

Для деконтаминации воздуха производственных помещений обычно используются те же реагенты, что и для стерилизации воздуха. Основные из них представлены в табл. 6.3.

### **6.3. Реагенты для деконтаминации воздуха производственных помещений**

Вещество	Температура кипения, °С	«Рабочая» концентрация в воздухе, мг/л или мг/м <sup>3</sup>
Формальдегид	21,0	3–10
Окись этилена	10,6	400–1000
Окись пропилена	34,0	800–2000
β-пропилактон	163,0	2–5



**Контрольные вопросы**

1. Асептические производства.
2. Способы, обеспечивающие исключение попадания посторонней микрофлоры в производственных процесс.
3. Промышленные способы стерилизации.
4. Установка непрерывной стерилизации.
5. Особенности стерилизации оборудования.
6. Показатели эффективности процесса термической стерилизации.
7. Особенности стерилизации воздуха, подаваемого на стадию ферментации. Фильтрационные системы.
8. Системы очистки газоздушных выбросов от живых клеток микроорганизмов.
9. Системы очистки от пылевых выбросов.
10. Системы очистки сточных вод биотехнологических производств.
11. Термическая (паровая) деконтаминация.
12. Биологические методы очистки сточных вод.
13. Замкнутый цикл водоиспользования в биотехнологическом процессе.
14. Способы деконтаминации воздуха и производственных поверхностей.



## **7. Обеспечение микробиологической безопасности биотехнологических производств**

Микробиологическая безопасность биотехнологических производств обеспечивается следующими основными факторами:

- применением в технологическом процессе разрешенного для использования штамма или ассоциативных культур;
- присутствием сопутствующей микрофлоры в процессе производства и в готовом продукте в количестве, разрешенном регламентом;
- отсутствием среди сопутствующей микрофлоры патогенных микроорганизмов, инфицирующих производственный процесс и готовый продукт;
- соблюдением разработанных гигиенических нормативов по содержанию живых клеток микроорганизмов в производственной и селитебных зонах.

### **7.1. Микробиологический контроль производства**

Важной задачей микробиологического контроля биотехнологических производств, основанных на процессах микробного синтеза, является обеспечение строгой направленности и активности биосинтетических процессов, гарантирующих производство целевого продукта требуемого качества. Эта задача решается на основе контроля стадий подготовки посевного материала и физиологического состояния культуры в процессе культивирования.

Большинство биотехнологических процессов осуществляется в асептических условиях при периодическом культивировании микро-



организмов с применением защиты от проникновения посторонних микроорганизмов.

Микробиологический контроль таких производств включает:

- контроль чистоты и активности посевного материала;
- контроль стерильности подготовленной питательной среды для культивирования;
- контроль стерильности поступающего на все стадии технологического процесса воздуха;
- контроль микробиологической чистоты готового продукта.

Проблема обеспечения доминирования разрешенного к использованию штамма наиболее актуальна для производств, в которых культивирование осуществляется в незащищенных условиях. В таких производствах используются в качестве биообъекта непатогенные или условно-патогенные штаммы микроорганизмов. Особенное значение микробиологического контроля в этих случаях определяется тем, что многие непатогенные промышленные штаммы микроорганизмов относятся к тем же родам, а часто – и видам, среди которых встречаются и патогенные формы. Так, известны туберкулезные и сапрофитные микобактерии; холерный и холероподобный вибрион; патогенные и сапрофитные штаммы среди дрожжей *Candida tropicalis* и др.

В технологическом регламенте любого биотехнологического производства имеется раздел, включающий основные методы контроля, сроки и контролируемые стадии производства, с учетом особенностей технологии.

## **7.2. Оценка санитарно-микробиологического состояния окружающей среды биотехнологических производств**

Биологический аэрозоль, сопровождающий биотехнологические производства, является основным источником «биологического фактора».

Под биологическим аэрозолем понимают такой аэрозоль, в котором дисперсной фазой являются частицы, несущие на себе инактивированные или жизнеспособные клетки микроорганизмов, продукты их метаболизма, а также споры микроорганизмов и пыль растений.

Главная потенциальная опасность при работе с микроорганизмами – это вдыхание их с воздухом. При работе со спорами актиномицетов установлено, что в глубокие отделы легких (в альвеолы) могут попадать частицы размером 0,02–0,2 мкм.



Суспензионные микробные культуры легко образуют аэрозоль. Капли диаметром 0,1 мкм быстро осаждаются, высыхают в течение 0,4 с, при этом их диаметр уменьшается, и они переносятся воздушными потоками.

Частицы аэрозоля диаметром  $\leq 10$  мкм задерживаются в организме на 100%;  $\leq 5$  мкм – на 20–30%;  $\leq 0,1$  мкм – на 60%.

При санитарно-гигиенических исследованиях воздушной среды определяется количество клеток культуры-продуцента, общая обсемененность микроорганизмами и их групповой состав, количество белка, а также содержание других химических веществ. Целью такого исследования являются:

- выявление источников загрязнения воздушной среды;
- определение состава организованных выбросов, общеобменной вентиляции и неорганизованных выбросов производства;
- определение зависимости степени загрязнения воздушной среды от особенностей технологического процесса, оборудования и эффективности коллективных средств защиты;
- разработка и осуществление мероприятий по улучшению условий труда работающих, предупреждение загрязнения окружающей среды.

Критерием оценки санитарно-микробиологического состояния воздуха рабочей зоны служит предельно допустимая концентрация (ПДК) или ориентировочно безопасный уровень воздействия (ОБУВ) используемого в производстве штамма.

Оценка микробиологического состояния воздуха проводится на основании динамических исследований концентрации микроорганизмов.

По результатам контроля обсемененности воздуха в производственных помещениях и организованных выбросах определяется соблюдение гигиенических нормативов, ПДК микробных клеток в воздухе рабочей зоны, количественная характеристика эффективности работы оборудования, задерживающего и инактивирующего микрофлору.

Основными санитарно-гигиеническими характеристиками воздуха на биотехнологических производствах являются концентрации производственного штамма, посторонней микрофлоры и видовой состав последней.

Особенно важное значение имеет контроль за посторонней микрофлорой для технологий, основанных на незащищенных процессах ферментации, при использовании сырьевых источников, хорошо усваиваемых широким кругом микроорганизмов.



Источником загрязнения воздуха рабочей зоны микроорганизмами является технологическое оборудование.

Так, имеются данные, что при выращивании дрожжей на меласе в ферментерах могут присутствовать бактерии более 50 видов, принадлежащих к десятку родов.

При производстве микробиологических средств защиты растений, в частности, боверина, действующим началом которого является гриб *Beauveria bassiana*, также наблюдалось значительное загрязнение воздуха рабочей зоны производственным штаммом. Уже до начала работы воздух был значительно загрязнен спорами различных грибов – в 1 м<sup>3</sup> воздуха обнаружено до 10<sup>4</sup> спор *Beauveria bassiana*, до 10<sup>3</sup> спор *Penicillium* и до 10<sup>2</sup> спор *Aspergillus niger*. В течение рабочего дня концентрация спор гриба *Beauveria bassiana* в воздухе производственных помещений увеличивалась в 5–7 раз.

При производстве кормового препарата бацитрацина отмечено, что общая обсемененность воздуха производственных помещений в среднем по заводу составляла 10<sup>3</sup> микробных тел в 1 м<sup>3</sup> воздуха. Численность стафилококков составляла 15–16 микробных тел, плесневые грибы были обнаружены в количестве 80–85 микробных тел, производственный штамм – 10<sup>3</sup> микробных тел. Максимальное микробное загрязнение (в основном, производственным штаммом) отмечалось в отделении ферментации и фасовки – до 10<sup>4</sup> микробных тел.

Метод определения микроорганизмов в воздухе рабочей зоны основан на подсчете колоний, выросших на агаризованной питательной среде при осаждении микроорганизмов из воздуха специальными приборами, улавливающими микробные аэрозоли (например, щелевой аппарат Кротова, импакторы и др.).

Отбор проб воздуха для бактериологического анализа, осуществляется методом инерционного осаждения, обеспечивающего аспирацию воздуха до 20–40 л/мин и время отбора пробы – до 30 мин. Улавливающая эффективность аппарата составляет 50% для частиц с диаметром 3,6 мкм, до 95% – для частиц с большим диаметром. Прибор устанавливается в точке контроля на ровной горизонтальной поверхности в зоне дыхания на высоте 1,5 м.

Помимо воздушной среды, в каждой контрольной точке проводятся санитарно-микробиологические исследования поверхностей технологического оборудования, стен помещений, спецодежды работающих.

Параллельно проводится отбор проб пыли из воздуха для определения содержания в ней белка.



### **Контрольные вопросы**

1. Основные задачи микробиологического контроля производства.
2. Основное содержание работ по санитарно-гигиеническому исследованию воздушной среды.
3. Что такое биологический аэрозоль?
4. Методы отбора воздуха для определения в нем содержания микроорганизмов.
5. Методы определения обсемененности воздуха.



## **8. Основные положения санитарных правил гигиены труда на биотехнологических производствах**

В соответствии с гигиенической классификацией труда, биологические факторы рассматриваются как потенциально опасные и вредные.

Под вредным производственным фактором подразумевается фактор, воздействие которого на работающего в определенных условиях может привести к заболеванию или стойкому снижению работоспособности.

Опасным производственным фактором считается такой фактор, воздействие которого на работающего в определенных условиях может привести к травме или другому внезапному резкому ухудшению здоровья.

В соответствии со степенью отклонения параметров качества производственной среды от действующих гигиенических нормативов и влияния на функциональное состояние и здоровье работающих выделяются 3 класса условий и характера труда (табл. 8.1).

I класс – оптимальные условия и характер труда;

II класс – допустимые условия, при которых уровень опасных и вредных производственных факторов не превышает установленных гигиенических нормативов на рабочих местах;

III класс – вредные и опасные условия и характер труда.

Выделяется 3 степени вредных и опасных условий труда:

- I степень – условия и характер труда, вызывающие функциональные нарушения, которые при раннем выявлении и прекращении воздействия носят обратимый характер;



- 2 степень – условия и характер труда, вызывающие стойкие функциональные нарушения, рост заболеваемости с временной утратой трудоспособности;
- 3 степень – условия и характер труда с повышенной опасностью развития профессиональных заболеваний.

Для обеспечения здоровых и безопасных условий труда важное значение приобретают соблюдение системы стандартов безопасности труда, строгое ведение технологических режимов производства, выполнение рекомендаций, разработанных на основе изучения и эксплуатации существующих биотехнологических производств, безопасной организации рабочих мест и производства в целом, правильного поведения персонала, соблюдение общей и личной гигиены.

### 8.1. Классификация «биологических факторов» биотехнологических производств

Биологические факторы	Классы условий и характера труда				
	I – оптимальные	II – допустимые	III – вредные и опасные		
			1 степень	2 степень	3 степень
1. Микроорганизмы, включая патогенные					
I класс опасности	–	≤ ПДК	до 2 раз	2,1–4	> 4
II класс опасности	–	≤ ПДК	до 3 раз	3,1–4	> 6
III класс опасности	–	≤ ПДК	до 5 раз	5,1–10	> 10
2. Белковые препараты					
I класс опасности	–	≤ ПДК	до 3 раз	3,1–5	> 5
II класс опасности		≤ ПДК	до 5 раз	5,1–10	> 10
III класс опасности		≤ ПДК	до 10 раз	10,1–20	> 20
3. Компоненты клетки (аминокислоты, витамины и др.)					
I класс опасности	–	≤ ПДК	до 5 раз	5,1–10	> 10
II класс опасности	–	≤ ПДК	до 7 раз	7,1–15	> 15
III класс опасности	–	≤ ПДК	до 10 раз	10,1–20	> 20

Большое значение для обеспечения микробиологической безопасности биотехнологических производств имеет правильно проведенная санитарно-гигиеническая оценка предприятия, в частности, исследования воздушной среды на промышленной площадке, в рабочей и санитарно-защитной зонах.



Важным законодательным документом, регламентирующим безопасность производства и применения продуктов биотехнологии, являются Санитарные правила и нормативы (СанПиН). Ими должны руководствоваться в ходе госнадзора и контроля органы, осуществляющие госсанэпиднадзор, государственные и природоохранные органы. Изложенные в СанПиН гигиенические требования направлены на обеспечение безопасности и сохранение здоровья людей, работающих в биотехнологических производствах, а также обеспечение максимальной безопасности биологического фактора для населения и окружающей среды.

В соответствии с санитарными требованиями, персонал биотехнологического производства должен обеспечиваться спецодеждой, спецобувью, индивидуальными средствами защиты. Сотрудники, работающие в цехах с живыми культурами микроорганизмов, обеспечиваются спецодеждой из хлопчатобумажных тканей, пропитанных антисептиками, например, гексахлорфенолом, угнетающим на дрожжи. Спецодежда регулярно, не реже 1 раза в неделю, должна дезинфицироваться. На рабочих местах, где имеются выбросы пыли стирка, обеспыливание и дезинфекция спецодежды должны проводиться после каждой смены.

Спецодежда и индивидуальные средства защиты хранятся отдельно от личной одежды и не выносятся за пределы предприятия.

Сотрудники, работающие с биомассой и в постоянном контакте с водой или с раздражающими кожу рук веществами, должны пользоваться специальными препаратами или защитными кремами.

Резиновые перчатки, прорезиненные фартуки и т. п. после работы моются и дезинфицируются 5%-ным раствором хлорной извести, а загрязненные микроорганизмами открытые участки тела промывают 0,5–1,0%-ным раствором хлорамина.

Для защиты органов дыхания от производственной пыли, содержащей живые и инактивированные клетки микроорганизмов, персонал должен использовать индивидуальные респираторы, а по окончании работы – мыться под душем. Стирка рабочей одежды осуществляется в прачечной предприятия не реже 1 раза в неделю.

На рабочих местах запрещается принимать пищу, хранить продукты питания.

Помещения, где имеются выбросы пыли готового продукта, аэрозолей химических веществ и микроорганизмов продуцентов, оборудуются приточно-вытяжной вентиляцией. Скорость приточной струи должна быть в пределах 0,2–0,3 м/с.



В производственных помещениях, где идут работы с живыми культурами, проводится ежедневная влажная уборка дезинфицирующими средствами (1%-ным раствором хлорной извести, 0,1%-ым раствором гипохлорита калия, 3%-ным раствором лизола).

В помещениях сушки, упаковки, склада готовой продукции должны проводиться ежедневные сухие уборки с помощью промышленных пылесосов или аспирационных систем.

При поступлении на работу на биотехнологическое предприятие работник проходит предварительный медицинский осмотр, а затем периодические медицинские осмотры не реже 1 раза в год.

Санитарный надзор и контроль безопасности производства и применения биотехнологической продукции осуществляют органы Госсанэпиднадзора.

В Федеральном законе «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (1999 г.) отмечено, что выполнение санитарно-эпидемиологических требований обеспечения безопасности среды обитания – одно из главных условий сохранения здоровья человека.



### Рекомендуемая литература

1. Винаров А.Ю., Гордеев Л.С., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза. – М.: ДеЛи принт, 2005. – 278 с.
2. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Ширококов В.П. Медицинская и санитарная микробиология. – М.: Академия, 2009. – 464 с.
3. Домарадский И.В., Ермолаев А.В. Основы бактериологии для экологов. – М.: РУДН, 1999. – 211 с.
4. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. – М.: Наука, 2004. – 348 с.
5. Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации на 2009–2013 гг. Утв. распоряж. Правительства РФ №74-р от 20.01.2008.
6. Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В., Иванов А.А., Киселев В.И., Нетесов С.В., Северин С.Е., Семенов Б.Ф., Сергиев В.П., Щелкунов С.Н. Биологическая безопасность. – М.: Медицина, 2006. – 304 с.
7. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2007. – 765 с.
8. Предельно-допустимые концентрации (ПДК) микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест и в воздухе рабочей зоны. – М.: Роспотребнадзор, 2007.
9. Ройт А., Бростофф Дж., Мейбл В. Иммунология. – М.: Мир, 2000. – 593 с.
10. Сборник гигиенических нормативов. ГН 2.1.6.21.77-07 и ГН 2.2.6.2178-07.
11. Экологогигиеническая оценка крупнотоннажных микробиологических производств. Сб. трудов. – М.: Моск. мед. акад. им. И.М. Сеченова, 1996.



## СОДЕРЖАНИЕ

Глава 1. Биотехнология: этапы развития.....	3
Глава 2. Объекты биотехнологии .....	9
Глава 3. Биотехнологические производства. Технологические схемы. Источники эмиссии .....	36
Глава 4. Санитарно-гигиеническая характеристика «биологического фактора» .....	42
4.1. Живые и инактивированные клетки микроорганизмов .....	42
4.1.1. Понятие об инфекционном процессе .....	42
4.1.2. Понятие иммунитета .....	55
4.1.3. Генноинженерные штаммы .....	62
4.2. Продукты микробиологического синтеза, как «биологический фактор».....	63
Глава 5. Гигиеническое обеспечение биологической безопасности биотехнологических производств.....	73
5.1. Санитарно-гигиеническая оценка биологического объекта и готовых продуктов, включающих живые клетки продуцента .....	76
5.1.1. Комплексная оценка промышленных штаммов.....	76
5.1.2. Определение патогенности штаммов.....	78
5.1.3. Обоснование ПДК живых клеток микроорганизмов в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе .....	80
5.2. Санитарно-гигиеническое нормирование биотехнологических продуктов, содержащих инактивированные клетки .....	86
5.2.1. Определение сенсibiliзирующих свойств «биологического фактора» и установление порога аллергического воздействия .....	86
5.2.2. Обоснование ПДК сухого препарата в воздухе рабочей зоны .....	89
5.3. Санитарно-гигиеническое нормирование гидролитических ферментов и других препаратов – продуктов метаболизма биологического объекта .....	91



<b>Глава 6. Инженерно-технологическое обеспечение безопасности биотехнологических производств .....</b>	<b>102</b>
6.1. Асептические производства .....	103
6.2. Системы очистки газовойоздушных выбросов биотехнологических производств .....	115
6.3. Системы очистки сточных вод биотехнологических производств .....	118
6.4. Деконтаминация воздуха и производственных поверхностей .....	121
<b>Глава 7. Обеспечение микробиологической безопасности биотехнологических производств .....</b>	<b>124</b>
7.1. Микробиологический контроль производства .....	124
7.2. Оценка санитарно-микробиологического состояния окружающей среды биотехнологических производств.....	125
<b>Глава 8. Основные положения санитарных правил гигиены труда на биотехнологических производствах .....</b>	<b>129</b>
<b>Рекомендуемая литература.....</b>	<b>133</b>



Учебное издание

**Градова Нина Борисовна  
Бабусенко Елена Сергеевна  
Панфилов Виктор Иванович**

**Биологическая безопасность  
биотехнологических производств**

Главный редактор *О. В. Саламаха*  
Редактор *Г. И. Елагин*  
Художественный редактор *Н. И. Смирнова*  
Технический редактор *О. Д. Хилиль*  
Художник *Л. Б. Саламаха*

Подписано в печать 16.04.10. Формат 60×90 1/16. Бумага офсет № 1. Гарнитура «Таймс».  
Усл. печ. л. 8,5. Уч. изд. л. 6,1. Тираж 1000 экз. (1-й завод 1–500 экз.) Заказ № 1328.

Издательство «ДелЯ принт».  
123181. г. Москва, а/я 42, тел (495)708-4650; [www.deli.ru](http://www.deli.ru)

Отпечатано в ООО ПФ «Полиграфист» 160001 г. Вологда, ул. Челюскинцев. 3.