

БЮЛЛЕТЕНЬ



Российского регистра потенциально
опасных химических
и биологических веществ

НОВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

УДК 615.9

МИКРООРГАНИЗМ YARROWIA LIPOLYTICA 2КР ВКПМ Y-4043

Н.И. Шеина¹, Э.Г. Скрябина¹, Л.И. Мясина¹,
Е.В. Буданова², Л.П. Сазонова¹,
В.В. Колесникова¹, Г.Г. Чуб¹

¹ГБОУ ВПО «Российский национальный
исследовательский медицинский университет им.
Н.И.Пирогова» МЗ РФ, 117997, г. Москва, Российская
Федерация

²ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова» МЗ
РФ, 119991 г. Москва, Российская Федерация

Оценена опасность микроорганизма Микроорганизм *Yarrowia lipolytica* 2кр ВКПМ Y-4043 для здоровья человека. Рекомендованы для утверждения ПДК_{р.з.} *Yarrowia lipolytica* 2кр ВКПМ Y-4043 на уровне 5×10^2 кл/м³, пометка А; ПДК_{а.в.} - 50 кл/м³, пометка А

Ключевые слова: микроорганизм *Yarrowia lipolytica* 2кр ВКПМ Y-4043, опасность, ПДК_{р.з.}, ПДК_{а.в.}

Дрожжевая культура *Yarrowia lipolytica* 2кр выделена из загрязненных нефтепродуктами воды/стоков Московской области, природный изолят. Отобран по способности эффективно снижать содержание нефти в загрязненной ею воде, песке и почвах. Растет на средах с гексадеканом и нефтью в качестве единственных источников

углерода. Является компонента биопрепарата Ремисойл по биоремедиации почв, грунтов, водоемов и стоков от нефти и нефтепродуктов.

По результатам проведенного анализа нуклеотидной последовательности, кодирующей часть 18S рРНК исследуемого штамма, установлено что исследуемый штамм *Yarrowia lipolytica* (98%)

Шейна Наталья Ивановна (Sheina Natalia Ivanovna), доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры гигиены ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ, 117997, г. Москва, ni_sheina@mail.ru

Скрябина Эмилия Григорьевна (Skrjabina Jemilija Grigor'evna), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела медицинской химии и токсикологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ, 117997, г. Москва, let@mail.ru

Буданова Елена Вячеславовна (Budanova Elena Vjacheslavovna), кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» МЗ РФ, 119991 г. Москва, e.v.budanova@mail.ru

Мясина Любовь Ивановна (Mjalina Ljubov' Ivanovna), кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры гигиены ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ, 117997, г. Москва, gigea@rsmu.ru

Сазонова Любовь Павловна (Sazonova Ljubov' Pavlovna), кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры гигиены ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ, 117997, г. Москва, gigea@rsmu.ru

Колесникова Валентина Васильевна (Kolesnikova Valentina Vasil'evna), кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры гигиены ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ, 117997, г. Москва, gigea@rsmu.ru

Чуб Галина Георгиевна (Chub Galina Georgievna), кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры гигиены ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ, 117997, г. Москва, gigea@rsmu.ru

Аэроб. Способен к росту на средах, содержащих источники углерода. Мезофил. Рост очень хороший – через 24 часа при 25-28°C образует колонии на глюкозо-пептонном агаре. При температуре 42°C не растет. Выдерживает концентрации хлорида натрия до 1% и немного более.

Штамм растет на жидких и агаризованных средах (МПА, АГВ, картофельный агар). Можно культивировать на LB агаре и бульоне или глюкозо-минеральной среде. На LB-агаре на 2-е и 3-и сутки вырастают колонии белого цвета, сухие, круглые, поднимающиеся над агаром. Края колонии ровные, у старой культуры возможно образование складок и концентрических кругов различной плотности. Максимальный диаметр – 10-12 мм.

Клетки круглые, эллипсоидные или удлинённые. Бесполое размножение – многосторонним почкованием на узком основании. Образуется псевдомицелий или истинный мицелий, который может иногда распадаться на артрспоры. Аски не конъюгативные, образуются из диплоидных клеток гиф. Оболочка аска быстро растворяется. В аске 1-4 аскоспоры, шаровидные, полусферические или шляповидные.

Способен расти в присутствии циклогексимида, обладает уреазой, нитрат не использует, сахара не сбраживает. В роде один вид, известный своей способностью к интенсивному образованию липолитических и протеолитических ферментов. Телеоморфа – *Candida paralipolytica*. Встречается у человека и других млекопитающих, в зерне, маслах и нефтепродуктах. Штамм *Yarrowia lipolytica* 2кр депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКПМ У-4043.

В процессе экспериментальных исследований были изучены патогенные свойства, влияние микроорганизма на интегральные показатели состояния организма экспериментальных животных и микрофлору кишечника, иммунотоксические свойства и возможность диссеминации его во внутренние органы с целью установления лимитирующего критерия вредного действия (ЛКВД).

Для характеристики возможных патогенных свойств штамма *Y. lipolytica* 2кр ВКПМ У-4043 в экспериментальных условиях на мышах были определены следующие параметры: средневирulentная доза, «пороговая» доза, токсигенность и способность к диссеминации штамма в кровь и внутренние органы в течение 30 дней.

Показано, что при однократном внутрибрюшинном введении высоких доз микроорганизм не проявляет вирулентных свойств ($DV_{50} > 3 \times 10^{10}$ кл/жив.). «Пороговая» доза микроорганизма в наших экспериментах составила 3×10^{10} микробных клеток/жив. при однократ-

ном внутрибрюшинном введении штамма, что свидетельствует о низкой способности штамма к инвазивности из брюшной полости в кровяное русло и не превышает допустимых значений, представленных в нормативных документах. В соответствии с методическими рекомендациями (1992г.) «пороговая» доза для непатогенных штаммов должна составлять более 10^7 кл/жив.

Токсигенные свойства штамма не были выявлены при введении чистого центрифугата и его 2-х кратных разведений, т.е. токсигенность штамма отсутствует (в соответствии с нормативными документами токсигенность для непатогенных микроорганизмов должна быть равна 0).

Результаты исследования способности к диссеминации изучаемого штамма показали, что *Y. lipolytica* 2кр обладает способностью к кратковременному персистированию в организме теплокровных животных в течение 3-10 дней при однократном внутрибрюшинном введении микроорганизма в дозе $3 \times 10^{10-8}$ кл/жив., но не способен к диссеминации в крови и внутренних органах.

Обследование экспериментальных животных показало, что воздействие штамма в двух концентрациях (5×10^3 и 5×10^4 кл/м³) в течение 1 месяца не приводило к изменению интегральных показателей состояния организма экспериментальных животных, которое оценивалось нами по динамике массы тела в процессе эксперимента и в восстановительном периоде.

В результате проведенных исследований по изучению иммунотоксических свойств микроорганизма установлено отсутствие изменений коэффициентов массы иммунокомпетентных органов (тимус, селезенка) экспериментальных животных по сравнению с животными контрольной группы. В лейкограмме периферической крови подопытных животных при воздействии большой концентрации штамма обнаружено достоверное изменение относительного содержания лимфоцитов в сторону снижения, сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов в сторону увеличения. Отмечено изменение баланса иммунокомпетентных клеток в сторону значимого снижения Т-лимфоцитов и тенденции к увеличению В-лимфоцитов, а также снижения соотношения Т/В.

При оценке сенсibiliзирующей активности штамма в эксперименте выявлено формирование клеточной реакции немедленного типа (ГНТ) на крысах при воздействии штамма в обеих концентрациях.

В экспериментах на крысах ответ на эритроциты барана, оцениваемого по титрам гуморальных антител-гемагглютининов, был аналогичен таковому в контрольной группе как по средним

значениям, так и вариабельности показателя внутри группы.

Бактериологические исследования микрофлоры кишечника показали, что на фоне хронического воздействия *Y. lipolytica* 2кр не происходит значимого изменения (дисбаланса) микробиоценоза кишечника крыс.

Штамм не оказывает ощутимого влияния на показатели анаэробной составляющей (бифидобактерии, лактобациллы) микробиоценоза кишечника. Вместе с тем отмечается влияние штамма в большой концентрации на высеваемость условно-патогенной микрофлоры (*E. faecium*, стафилококки). Коэффициент массы слепой кишки не различается у крыс контрольной и подопытных групп. В восстановительном периоде микрофлора кишечника крыс, подвергшихся воздействию дрожжевого гриба в обеих концентрациях, по качественным и количественным показателям не отличается от таковых контрольных животных.

Штамм при хроническом воздействии в обеих концентрациях не обладал способностью к диссеминации в кровь и внутренние органы (легкие, печень, почки, селезенка) экспериментальных

животных ни через 1 месяц введения микроорганизма, ни через 2 недели восстановительного периода.

Анализ совокупности полученных экспериментальных данных свидетельствует о том, что пороговая концентрация находится на уровне 5×10^3 кл/м³

В настоящее время различные представители рода *Candida* имеют законодательно утвержденные гигиенические нормативы – *C. lipolytica*, *C. maltosa*, *C. scotti*, *C. tropicalis*, *C. valida*, *C. utilis*. Величины ПДК этих штаммов в воздухе рабочей зоны находятся в пределах от 2×10^2 до 10^3 кл/м³, а величины ПДК в атмосферном воздухе населенных мест – в пределах от 20 до 10^2 кл/м³ (ГН 2.1.6.2177-07 и ГН 2.2.6.2178-07, утверждены постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 06.03.2007, № № 9, 10). Исходя из собственных данных и принимая во внимание величины ПДК родственных микроорганизмов в таксономическом отношении, рекомендована ПДК штамма *Y. lipolytica* 2кр ВКПМ Y-4043 на уровне 5×10^2 кл/м³, пометка А, ПДК_{а,в} – на уровне 50 кл/м³, пометка А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологиче-

ского синтеза. Мет. реком., РГМУ, М., 1992, 22 с.

2. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микро-

организмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды. N5789/1-91. М., 1991, 22 с.

3. Определитель бактерий Берджи. Под ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, Дж. Снита и др. -Девятое изд. -М., «Мир», 1997. - 2т.

REFERENCES:

1. Criteria of assessment the pathogenic properties of producer strains proposed for use in industrial microbiological synthesis. Methodical. recommendations, Medical

University, Moscow, 1992, 22 p. (in Russian).

2. Guidelines on experimental justification of the limit permitted concentration of

producing microorganisms and their containing strains products in industrial and environmental objects. N5789/1-91. - M., 1991. - 22 p. (in Russian).

3. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Ed. J. G. Holt, N. R. Krieg, P.H.A. Sneath et al. -M., «Mir». -1997. - 2v. (in Russian).

N.I. Sheina¹, J.G. Skryabina¹, L.I. Myalina¹, E.V. Budanova², L.P. Sazonova¹, V.V. Kolesnikova¹, G.G. Chub¹

MICROORGANISM *Yarrowia lipolytica* 2 kp ВКПМ Y-4043

¹ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, RF Ministry of Healthcare, Russian Federation

² I.M. Sechenov Moscow State Medical University, RF Ministry of Health, 119991 Moscow, Russian Federation

Hazard assessment of the microorganism *Yarrowia lipolytica* 2 kp ВКПМ Y-4043 to human health was carried out. TLV/TWA_{working zone} on the level of 5×10^2 cells/m³, mark A, and TLV/TWA_{atmospheric air} on the level of 50 cells/m³, mark A for *Yarrowia lipolytica* 2 kp ВКПМ Y-4043 are recommended for approval.

Key words: microorganism *Yarrowia lipolytica* 2 kp ВКПМ Y-4043, hazard, TLV/TWA_{working zone}, TLV/TWA_{atmospheric air}

Материал поступил в редакцию 12 ноября 2014 г.