

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ШТАММА *BACILLUS ATROPHAEUS* ВКПМ В-11474, ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МИКРОБНОГО БИОПРЕПАРАТА КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ*

Ольга Борисовна Сопрунова¹, доктор биологических наук, профессор

Вера Евгеньевна Сопрунова¹, старший преподаватель

Анна Викторовна Луценко^{1,2}, кандидат биологических наук, доцент

Нармина Муталлимага-кызы Габитова², ассистент

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет», г. Астрахань, Россия

²ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, г. Астрахань, Россия

E-mail: soprunova@mail.ru

Аннотация. Исследована безопасность для здоровья человека и животных основного компонента (штамм *Bacillus atrophaeus* В-11474) микробного биопрепарата комплексного действия для повышения урожайности и защиты сельскохозяйственных растений от болезней по показателям вирулентности, острой токсичности, токсигенности и способности к диссеминации. Представители рода *Bacillus* известны как продуценты широкого спектра соединений-антагонистов различной структуры (бактериоцины, антимикробные пептиды и липопептиды, поликетиды и сидерофоры), обладающих ростостимулирующими и защитными свойствами. Тестированием на белых мышах линии Balb/c установлена непатогенность штамма *Bacillus atrophaeus* В-11474. Исследуемый штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Работу с животными проводили с соблюдением всех требований и этических норм, соответствующих правилам GLP. Результаты изучения суспензии живой культуры *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В-11474 не выявили негативного влияния на подопытных животных, что свидетельствует об отсутствии вирулентности, острой токсичности, токсигенности и диссеминации. Мыши активно потребляли корм и воду, были подвижны, с адекватной реакцией на экспериментаторов и физические факторы, летального исхода не наблюдали. При вскрытии животных видимых изменений во внутренних органах не было – легкие, сердце, почки, селезенка, печень нормальной структуры и окраски. В мазках-отпечатках внутренних органов тестируемая культура не обнаружена. Штамм *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В-11474 – перспективный компонент биопрепарата, безопасный для применения в сельском хозяйстве и может быть использован в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: штамм *Bacillus atrophaeus* В-11474, безопасность, бактерии, живая культура, патогенность, токсичность, токсигенность

SAFETY ASSESSMENT OF *BACILLUS ATROPHAEUS* STRAIN VKPM V-11474, WHICH IS PROMISING FOR THE DEVELOPMENT OF A MICROBIAL BIOLOGICAL PRODUCT WITH COMPLEX ACTION

O.B. Soprunova¹, *Grand PhD in Biological Sciences, Professor*

V.E. Soprunova¹, *Senior Lecturer*

A.V. Lutsenko^{1,2}, *PhD in Biological Sciences, Associate Professor*

N.M. Gabitova², *Assistant*

¹Astrakhan State Technical University, Astrakhan, Russia

²Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian, Astrakhan, Russia

E-mail: soprunova@mail.ru

Abstract. Representatives of the genus *Bacillus* are known as producers of a wide range of antagonist compounds of different structures (bacteriocins, antimicrobial peptides and lipopeptides, polyketides and siderophores) with growth-stimulating and protective properties. A necessary condition for the use of microbial objects in biotechnological processes is safety for human and animal health. The safety of *Bacillus atrophaeus* В-11474 strain, which is the basis of a microbial biopreparation of complex action to increase the yield and protect agricultural plants from diseases according to the indicators of virulence, acute toxicity, toxigenicity and ability to dissemination was studied. The non-pathogenicity of *Bacillus atrophaeus* strain В-11474 was established by testing on white Balb/c mice. The studied strain was deposited in the All-Russian Collection of Industrial Microorganisms (VKPM). The experiment was performed in compliance with all established regulatory requirements for work with laboratory animals according to GLP rules and ethical standards for handling animals. The results of investigation of *Bacillus atrophaeus* VKPM В-11474 live culture suspension revealed no adverse effect on the experimental animals, indicating the absence of virulence, acute toxicity, toxigenicity and dissemination. Mice actively consumed food and water, were motile, with adequate response to experimenters and physical factors, no lethal outcome was observed. The autopsy has shown that the surface of the internal organs was smooth, without visible pathology, with normal color and of dense structure. The test culture was not found in smears-imprints of internal organs. It was shown that *Bacillus atrophaeus* strain VKPM В-11474 is promising for obtaining a biopreparation safe for use in agriculture and can be used for further research.

Keywords: safety, bacteria, live culture, pathogenicity, toxicity, toxigenicity

* Исследования проведены за счет средств на выполнение государственного задания в рамках НИОКР «Аборигенные микроорганизмы – основа новых эко- и агробιοтехнологий Прикаспийского региона» (№ 123031400044-2) / The research was carried out at the expense of funds for the implementation of the state task within the framework of R&D “Indigenous microorganisms – the basis of new eco- and agrobiotechnologies of the Caspian region” (No. 123031400044-2).

Основные средства защиты растений – химические пестициды, но их могут полностью или частично заменить биологические препараты, для разработки которых используют различные плесневые грибы и бактерии, в том числе рода *Bacillus*. [5, 7, 9, 11] Они известны как продуценты широкого спектра соединений-антагонистов различной структуры (бактериоцины, антимикробные пептиды и липопептиды, поликетиды и сидерофоры), обладающих ростостимулирующими и защитными свойствами. [15] *Bacillus atrophaeus* – перспективный вид бактерий для получения биопрепаратов, повышающих урожайность и защищающих растения от болезней. [2, 6] Но их применение может сопровождаться загрязнением окружающей среды и оказывать неблагоприятное влияние на здоровье людей. В соответствии с ФЗ РФ № 492 «О биологической безопасности в Российской Федерации», биологическая безопасность – состояние защищенности населения и окружающей среды от воздействия опасных биологических факторов, при котором обеспечивается допустимый уровень биологического риска. Все микроорганизмы, используемые в различных сферах, в том числе сельском хозяйстве, должны быть оценены по уровню патогенности и отвечать установленным требованиям безопасности. [10, 13].

Цель работы – исследовать безопасность штамма *Bacillus atrophaeus* В-11474, как основного компонента микробного биопрепарата, предназначенного для повышения урожайности и защиты сельскохозяйственных растений от болезней, по показателям вирулентности, острой токсичности, токсигенности и способности к диссеминации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследований – штамм *Bacillus atrophaeus*, изолированный из природной среды в научно-исследовательской лаборатории микробиологического мониторинга кафедры «Прикладная биология и микробиология» ФГБОУ ВО «Астраханский государственный технический университет» по стандартным методикам, депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) под номером В-11474. [8]

Безопасность живой культуры *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В-11474 оценивали на базе вивария ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры», входящего в состав ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (на основании Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.11.2021 № 1029 с 01.04.2022 года).

В работе использовали 120 белых мышей одного рода и происхождения (линия Balb/c) массой 18...22 г, которых в период адаптации и на протяжении всего эксперимента содержали с соблюдением всех установленных нормативных требований и этических норм обращения с животными (карантин, санитарный контроль, режим питания, освещения и другое), соответствующих правилам GLP. [1, 3, 4]

Мышам контрольной группы вводили физиологический раствор в объеме, аналогичном дозе применяемых суспензий для опытных животных.

Безопасность *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В-11474 определяли по показателям: вирулентность, острая токсичность, токсигенность и способность к диссеминации. Исследуемое вещество вводили парентерально (внутрибрюшинно).

Вирулентность устанавливали после введения мышам 1 мл суточной живой культуры *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В-11474 концентрацией $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мышь. В эксперименте использовали 20 мышей, по 10 особей в каждой группе. Наблюдали за животными в течение 30 сут. Для изучения способности к диссеминации проводили их забой и вскрытие (через каждые семь суток) с соблюдением установленных требований для патологоанатомического исследования на основании макроскопического (визуальная оценка легких, сердца, почек, селезенки, печени) и микроскопического (внутренние органы высевали методом отпечатков на мясопептонный агар, полученные колонии окрашивали по Граму и микроскопировали) анализов.

Острую токсичность определяли после однократного введения бактериальной суспензии термоинактивированной культуры *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В-11474 (концентрация $1,0 \times 10^{10}$ КОЕ/мышь) внутрибрюшинно мышам опытной группы. Всего было две группы животных, по 10 особей в каждой. Наблюдали за мышами в течение 14 дн. (клинический осмотр, взвешивание, регистрация потребления пищи и воды).

Токсигенность проверяли после внутрибрюшинного введения мышам фильтрата исследуемой культуры микроорганизмов в разных дозировках (по 1,0 и 1,7 мл трехсуточной и 0,8, и 1,5 мл семи-суточной). В эксперименте использовали 80 особей, по 10 мышей в группе. Наблюдали за животными 30 сут., в течение которых проводили клинический осмотр, взвешивание, регистрировали потребление пищи и воды.

Результаты экспериментов обрабатывали статистически, используя пакет программ «BioStat-2009» (Analist Soft Ins., США) и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При определении вирулентности и диссеминации за весь срок наблюдения у мышей отсутствовали признаки интоксикации, групповая масса тела увеличилась и все животные остались живы, что свидетельствует о том, что минимальная смертельная доза не установлена и превышает $1,0 \times 10^7$ КОЕ/мышь. Штамм микроорганизмов в данной концентрации не обладает вирулентностью. У вскрытых мышей патологоанатомических изменений не обнаружено, структура внутренних органов гладкая, плотная, нормальной окраски. В мазках-отпечатках тестируемая культура не выявлена. При визуальной оценке внутренних органов лабораторных животных опытной и контрольной групп различий не обнаружено. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии способности штамма к диссеминации во внутренние органы и их бактериальному поражению.

При определении острой токсичности у мышей не было признаков нарушения здоровья и потери массы тела (табл. 1), летального исхода не наблю-

Таблица 1.

Динамика массы тела лабораторных мышей при изучении острой токсичности

Период	Масса мышей (г) при введении дозы (1мл) исследуемого вещества концентрацией 1,0x10 ¹⁰ КОЕ/мышь
До введения исследуемого вещества	19,3±0,3
14 дней после введения	20,4±0,3

Таблица 2.

Динамика выживаемости лабораторных мышей при изучении острой токсичности

Группа	Концентрация вводимого вещества, 1мл (КОЕ/мышь)	Выживаемость, %
Опытная	1,0x10 ¹⁰	100
Контрольная		100

дали (табл. 2). Отмечали их адекватную реакцию на манипуляции экспериментаторов, не визуализировали изменений состояния шерсти, кожных покровов и слизистых. Полученные данные свидетельствуют о том, что тестируемая культура в исследуемой концентрации (1,0x10¹⁰ КОЕ/мышь) не оказывает неблагоприятного воздействия на белых мышей и, следовательно, не обладает острой токсичностью.

При определении токсигенности в течение 30 сут. после введения фильтратов бактериальной культуры проводили клинический осмотр экспериментальных животных, взвешивание, регистрировали потребление пищи и воды. Установлено отсутствие влияния всех примененных дозировок на массу тела животных. Реакции на манипуляции экспериментаторов и на физические (освещение, шум и другое) раздражители оставались адекватными, что свидетельствует о том, что культура не токсигенна для теплокровных животных.

Таким образом, *Bacillus atrophaeus* ВКПМ В-11474 не обладает патогенными свойствами (острая токсичность, токсигенность, способность к вирулентности и диссеминации) в исследованных концентрациях и может быть использован в дальнейших разработках по получению биопрепарата для применения в сельском хозяйстве.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Асташкин Е.И., Ачкасов Е.Е., Афонин Е.Е. и др. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль-2С, 2010. 358 с. ISBN 978-5-903950-10-2.
- Баубекова Д.Г., Сопрунова О.Б., Байрамбеков Ш.Б., Полякова Е.В. Влияние биологического средства защиты растений на микробиоценоз сельскохозяйственных почв в условиях аридного климата // Юг России: экология, развитие. 2020. Т. 15. № 2. С. 78–90. DOI: 10.18470/1992-1098-2020-2-78-90.
- Виноградов П.Н., Шевченко С.С., Седов О.Л. и др. РД-АПК 3.10.07.02-09. Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений. Минсельхоз РФ, М., 2009. 27 с.
- ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики, с поправкой, М.: Стандартинформ. 2019. 16 с.
- Захарова Н.Г., Сираева З.Ю., Демидова И.П., Егоров С.Ю. Создание биопрепаратов, перспективных для сельского хозяйства // Ученые записки Казанского государственного университета. 2006. Т. 148. № 2. С. 102–111. https://kpfu.ru/portal/docs/F356003983/148_2_est_10.pdf
- Коряжкина М.Ф. *Bacillus atrophaeus* SKD-1 как перспективный штамм для разработки биопрепарата // Юг России: экология, развитие. 2010. Т. 5. № 4. С. 80–82. DOI: 10.18470/1992-1098-2010-4-80-82.
- Павлюшин В.А., Новикова И.И., Бойкова И.В. Микробиологическая защита растений в технологиях фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: теория и практика (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 3. С. 421–438. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.3.421rus
- Патент РФ на изобретение № 2655848. 29.05.2018 Бюл. № 16. МПК А01N 63/02, А01P 21/00. Сопрунова О.Б., Баубекова Д.Г., Байрамбеков Ш.Б. и др. Средство для повышения урожайности и защиты растений семейства пасленовых от фитопатогенных грибов. EDN: YXVAAT. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37372136>
- Петровский А.С., Каракозов С.Д. Микробиологические препараты в растениеводстве. Альтернатива или партнерство? // Защита и карантин растений. 2017. № 2. С. 14–18. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=28360468>
- Римарева Л.В., Серба Е.М., Оверченко М.Б. и др. Научно-экспериментальное обоснование безопасности биотехнологической продукции для пищевой промышленности // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2019. № 1. С. 40–43. DOI: 10.30850/vrsn/2019/1/40-43
- Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 29–37. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus.
- Чеботарь В.К., Петров В.Б., Шапошников А.И., Кравченко Л.В. Биохимические критерии оценки агрономически значимых свойств бацилл, используемых при создании микробиологических препаратов // Сельскохозяйственная биология. 2011. Т. 46. № 3. С. 119–122. <http://www.agrobiology.ru/3-2011chebotar'.html>
- Шейна Н.И. Критерии оценки биобезопасности микроорганизмов, используемых в биотехнологической промышленности // Вестник Оренбургского государственного университета. 2012. № 6 (142). С. 165–169. <http://vestnik.osu.ru/doc/1033/article/6478/lang/0>
- Штерншис М.В., Беляев А.А., Цветкова В.П. и др. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений. Новосибирск: Издательство Сибирского отделения РАН, 2016. 233 с. ISBN 978-5-7692-1496-7. EDN: XBZXBV.
- Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species // Journal of biotechnology. 2018. Vol. 285. PP. 44–55. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.

REFERENCES

1. Astashkin E.I., Achkasov E.E., Afonin E.E. i dr. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i al'ternativnym modelyam v biomeditsinskih issledovaniyah. M.: Profil-2S, 2010. 358 s. ISBN 978-5-903950-10-2.
2. Baubekova D.G., Soprunova O.B., Bajrambekov Sh.B., Polyakova E.V. Vliyanie biologicheskogo sredstva zashchity rastenij na mikrobiocenoze sel'skohozyajstvennykh pochv v usloviyah aridnogo klimata // Yug Rossii: ekologiya, razvitie. 2020. T. 15. № 2. С. 78–90. DOI: 10.18470/1992-1098-2020-2-78-90.
3. Vinogradov P.N., Shevchenko S.S., Sedov O.L. i dr. RD-APK 3.10.07.02-09. Metodicheskie rekomendatsii po sodержaniyu laboratornykh zhivotnykh v vivariyah nauchno-issledovatel'skikh institutov i uchebnykh zavedenij. Min-sel'hoz RF, M. 2009. 27 s.
4. GOST 33044-2014 Principy nadležashchej laboratornoj praktiki. s popravkoj, M.: Standartinform. 2019. 16 s.
5. Zaharova N.G., Siraeva Z.Yu., Demidova I.P., Egorov S.Yu. Sozdanie biopreparatov, perspektivnykh dlya sel'skogo hozyajstva // Uchenye zapiski Kazanskogo gosudarstvennogo universiteta. 2006. T. 148. № 2. S. 102–111. https://kpfu.ru/portal/docs/F356003983/148_2_est_10.pdf
6. Koryazhkina M.F. Bacillus atrophaeus SKD-1 kak perspektivnyj shtamm dlya razrabotki biopreparata // Yug Rossii: ekologiya, razvitie. 2010. T. 5. № 4. S. 80–82. DOI: 10.18470/1992-1098-2010-4-80-82.
7. Pavlyushin V.A., Novikova I.I., Bojkova I.V. Mikrobiologicheskaya zashchita rastenij v tekhnologiyah fitosantarnoj optimizatsii agroekosistem: teoriya i praktika (obzor) // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2020. T. 55. № 3. S. 421–438. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.3.421rus.
8. Patent RF na izobretenie № 2655848. 29.05.2018 Byul. № 16. MPK A01N 63/02, A01P 21/00. Soprunova O.B., Baubekova D.G., Bajrambekov Sh.B. i dr. Sredstvo dlya povysheniya urozhajnosti i zashchity rastenij semejstva paslenovykh ot fitopatogennykh gribov. EDN: YXVAAT. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37372136>
9. Petrovskij A.S., Karakotov S.D. Mikrobiologicheskie preparaty v rastenievodstve. Al'ternativa ili partnerstvo? // Zashchita i karantin rastenij. 2017. № 2. S. 14–18. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=28360468>
10. Rimareva L.V., Serba E.M., Overchenko M.B. i dr. Nauchno-eksperimental'noe obosnovanie bezopasnosti biotekhnologicheskoy produkcii dlya pishchevoj promyshlennosti // Vestnik rossijskoj sel'skohozyajstvennoj nauki. 2019. № 1. S. 40–43. DOI: 10.30850/vrsn/2019/1/40-43.
11. Sidorova T.M., Asaturova A.M., Homyak A.I. Biologicheski aktivnye metabolity Bacillus subtilis i ih rol' v kontrole fitopatogennykh mikroorganizmov // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2018. T. 53. № 1. S. 29–37. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus.
12. Chebotar' V.K., Petrov V.B., Shaposhnikov A.I., Kravchenko L.V. Biohimicheskie kriterii ocenki agronomicheski znachimykh svojstv bacill, ispol'zuemykh pri sozdanii mikrobiologicheskikh preparatov // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2011. T. 46. № 3. S. 119–122. <http://www.agrobiology.ru/3-2011chebotar'.html>
13. Sheina N.I. Kriterii ocenki biobezopasnosti mikroorganizmov, ispol'zuemykh v biotekhnologicheskoy promyshlennosti // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2012. № 6 (142). S. 165–169. <http://vestnik.osu.ru/doc/1033/article/6478/lang/0>
14. Shternshis M.V., Belyaev A.A., Cvetkova V.P. i dr. Bio-preparaty na osnove bakterij roda Bacillus dlya upravleniya zdorov'em rastenij. Novosibirsk: Izdatel'stvo Sibirskogo otdeleniya RAN, 2016. 233 s. ISBN 978-5-7692-1496-7. EDN: XBZXBV.
15. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by Bacillus species // Journal of biotechnology. 2018. Vol. 285. PP. 44–55. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.

Поступила в редакцию 19.05.2023

Принята к публикации 02.06.2023