

В.М.Самыгин¹, Т.А.Гришкина², Л.К.Жога², А.Ю.Александров¹,
С.В.Редкозубов¹, Нгуен Тхи Нгок Минь¹

СИСТЕМА ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АЭРОЗОЛЕЙ В УСТАНОВКАХ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹Волгоградский государственный технический университет,

²ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Представлена установка для культивирования микроорганизмов, оснащенная системой защиты окружающей среды от ферментационных выбросов. Установка помещена в бокс безопасности, оборудована вакуумным насосом, герметичными клапанами трубопроводов и последовательно соединенными емкостями с дезинфицирующими растворами. Приведены экспериментальные данные по сравнительной оценке инактивирующей способности табельных дезинфицирующих средств в отношении бактериальных аэрозолей при глубинном культивировании микроорганизмов.

Ключевые слова: бактериальные аэрозоли, установка для культивирования микроорганизмов, система защиты, биологическая безопасность.

Решение проблем инфекционной патологии во многом зависит от разработки и использования эффективных иммунобиологических препаратов, предназначенных для диагностики и профилактики инфекционных заболеваний. Современное производство таких препаратов обусловлено свойствами штаммов-продуцентов целевого продукта, лежащего в основе конструирования препарата, а с другой стороны, определяется особенностями биотехнологических процессов, начиная с этапа выращивания микроорганизмов. В качестве исходного сырья при производстве целевого продукта используют непатогенные, аттенуированные или вакцинные штаммы бактерий. К настоящему времени получены и используются вакцинные штаммы бактерий чумы, туляремии, бруцеллеза и сибирской язвы, тогда как у целого ряда других микроорганизмов такие штаммы до сих пор не созданы.

Для получения биомассы микроорганизмов или продуктов микробного синтеза предложены серийные установки (ферментеры, ферментаторы, реакторы), конструкции которых ориентированы, главным образом, на повышение эффективности и экономичности биотехнологического процесса и обеспечение условий, исключающих контаминацию штамма-продуцента посторонней микрофлорой. Процесс культивирования бактерий в таких установках ведется в жидкой питательной среде в условиях непрерывной принудительной аэрации и избыточного давления. Для повышения эффективности биотехнологического процесса применяется пульсационная подача аэрирующего воздуха [5], а для повышения стерильности процесса культивирования в установках создается избыточное давление, при этом постоянный поток отработанной газовой смеси исключает возможность проникновения в емкость не стерильного воздуха [2].

С целью защиты окружающей среды от ферментационных выбросов установки снабжают системой аварийного переключения потоков газа, содержащей

связанный трубопроводом с ферментером ресивер газа и подключенные к нему байпасные трубопроводы с клапанами, соединяющие входные и выходные патрубки для воздуха стерилизаторов, а также стерилизатором конденсата [7]. Однако чаще для защиты используют фильтрующие системы очистки. Известны системы бактериальной защиты установок, оборудованные в виде чехла, представляющего собой бактериальный фильтр тонкой очистки (ФТО) из двухслойной фильтрационной бумаги с проложенной между слоями тканью Петрянова, и адсорбера, расположенного на линии выхода газа из половолоконного мембранного аппарата [6]. В некоторых установках для культивирования микроорганизмов системы защиты окружающей среды от ферментационных выбросов практически отсутствуют [4].

Известные системы защиты окружающей среды от бактериальных аэрозолей, образующихся в результате насыщения бульонной культуры кислородом или газообразной смесью, имеют определенные недостатки. Применение наиболее распространенных фильтров тонкой очистки ограничено прочностью, сопротивлением и нормативными значениями коэффициента проницаемости фильтрующего материала, а также перепадом давлений, возникающим в процессе работы, и повреждениями, которые тотчас же не всегда можно установить. Кроме того, фильтры тонкой очистки малоэффективны для отделения мелких частиц, таких как вирусы и риккетсии, но нуждаются в специальной обработке (автоклавировании) или замене после адсорбции на их поверхности бактериальных клеток. А выращивание микробов в ферментерах при избыточном давлении напрямую сопряжено с реальной биологической угрозой вследствие образования мельчайших бактериальных аэрозолей и попадания аэрозольных частиц из культурального сосуда в окружающую среду. Поэтому использование ФТО в условиях избыточного давления ограничено и категорически недопустимо в установках при работе с возбудителями опасных инфекционных за-

болеваний [1].

Проблема биологической безопасности процессов культивирования патогенных микроорганизмов отчасти может быть решена за счет использования установок, в которых выращивание бактерий происходит в культуральном сосуде при более низком, по сравнению с атмосферным, давлением, а внесение инокулята и отбор проб биологического материала в процессе и по окончании работы осуществляется за счет создаваемой разницы давления между сосудами. Это обеспечивается благодаря оснащению установок вакуумным насосом, позволяющим регулировать давление воздуха, клапанами и системой очистки отработанного воздуха [3]. Безусловно, использование подобного принципа существенно снижает вероятность биологической угрозы при осуществлении биотехнологических процессов, однако для оценки эффективности очистки воздуха от образующихся бактериальных аэрозолей необходимы экспериментальные исследования.

Целью исследования явилось совершенствование средств и методов защиты окружающей среды от бактериальных аэрозолей в установках для культивирования микроорганизмов.

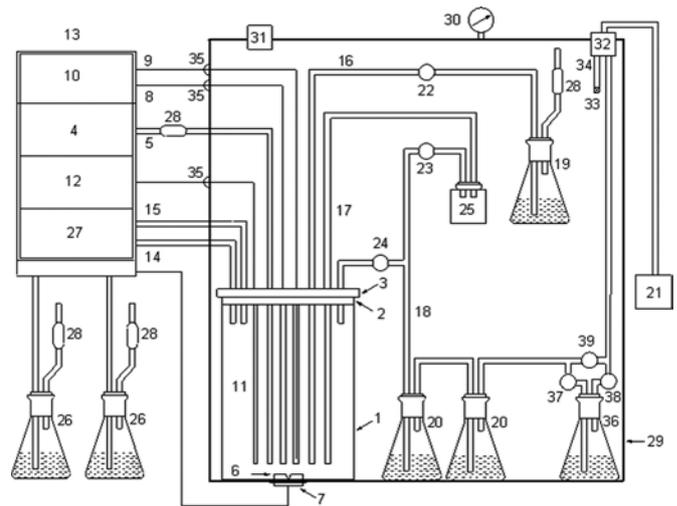
Материалы и методы

В работе использовали референтный индикаторный штамм *Serratia marcescens* 9, а в заключительной серии опытов *Yersinia pestis* ЕВ-НИИЭГ из коллекционного центра Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, которые выращивали на питательных средах на основе перевара по Хоттингеру, рН 7,2, с содержанием аминного азота 120 мг% и добавлением 1 % галактозы. Аппаратное культивирование осуществляли в лабораторной установке с объемом культурального сосуда 400 мл.

Индикаторную культуру засеивали в ферментер из расчета 10^8 кл/мл и выращивали глубинным методом в условиях непрерывной аэрации в течение 18–20 ч. Аэрацию питательной среды осуществляли путем подачи воздуха и перемешивания магнитной мешалкой. Расход используемого для аэрации воздуха составил 1 л/мин, что является максимальным для данной установки, скорость вращения мешалки – 400 об/мин. Концентрацию биомассы в процессе роста культуры определяли с помощью стандартного образца мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Результаты и обсуждение

Для защиты окружающей среды от бактериальных аэрозолей разработана и использована лабораторная установка [8], состоящая из культурального сосуда 1 с пробкой 2 и крышкой 3, компрессора 4, патрубком 5 для подачи воздуха в культуральный сосуд, перемешивающего устройства, включающего импеллер 6 и магнитный привод 7 (рисунок). В крышку



Система защиты от бактериальных аэрозолей в установках для культивирования микроорганизмов

культурального сосуда вмонтированы цилиндрические кожухи для нагревательного элемента 8 и термистора 9, связанные с термостатирующим устройством 10; рН-электрод 11, подключенный к рН-метру (в комплекте установки) 12, объединенному с компрессором 4 и термостатирующим устройством 10 в блок управления 13. В крышку вмонтированы также патрубки 14, 15, 16, 17, 18 соответственно для подачи в культуральный сосуд корректирующих растворов, внесения инокулята из инокулятора 19, отбора проб и выхода отработанного воздуха. Патрубок 18 для отбора отработанного воздуха из культурального сосуда ферментера соединен с емкостями 20 с дезинфицирующим раствором и вакуумным насосом МПВ-5 (Польша) 21. Патрубки снабжены клапанами 22, 23, 24 соответственно для регулирования внесения инокулята, отвода отработанного воздуха или отбора проб в пробоотборник 25, который служит также и для отбора конечного продукта после окончания культивирования. Каждая из содержащих корректирующий раствор емкостей 26 соединена патрубками 14, 15 с перистальтическим насосом 27, находящимся в блоке управления 13. В пробках емкостей 26 с корректирующими растворами и инокулятора 19, а также в патрубке 5 для подачи воздуха в культуральный сосуд установлены фильтры очистки воздуха 28 на основе спеченных никелевых порошков, фторопласта, керамики или другого пористого материала. Установка снабжена фабрично изготовленным и сертифицированным боксом безопасности ББП-1-ПЖ, оборудованным автономной системой приточно-вытяжной вентиляции и фильтрами тонкой очистки воздуха, проверенными на защитную эффективность. Бокс безопасности 29 оснащен манометром 30, входным 31 и выходным 32 фильтрами тонкой очистки воздуха соответственно, которые выполнены из того же материала, что и фильтры очистки воздуха, подаваемого в культуральный сосуд ферментера. Фильтр 32 является общим для очистки воздуха из культурального сосуда и бокса 29 и имеет регулирующее устройство 33

на патрубке 34, которое позволяет создавать перепад давления между полостью культурального сосуда и внутренним пространством бокса. На боковой стороне бокса безопасности установлены герметичные разъемы электрокоммуникаций 35. Скорость воздушного потока в проеме бокса составляет 0,4–0,75 м/с, а разрежение в боксе – 20 мм водяного столба по отношению к помещению лаборатории.

В качестве защитной системы окружающей среды от ферментационных выбросов в установке использовали последовательно соединенные емкости 20 с растворами различных дезинфицирующих средств, через которые барботировали отработанный при аэрации бульона воздух. Для абсорбции и обеззараживания бактериальных аэрозолей в системе установки в качестве дезинфицирующих средств были испытаны в регламентированных и более высоких концентрациях хлорамин, активированный раствор перекиси водорода и формальдегид, являющиеся табельными средствами в отношении микроорганизмов I–II групп патогенности [1].

Для бактериологического контроля воздуха между емкостями с дезинфицирующим раствором 20 и выходным фильтром 32 бокса безопасности к вакуумному трубопроводу подключали импинжер 36 через клапаны 37, 38, 39, представляющий контрольный сосуд с 300 мл бульона Хоттингера. Воздух через контрольный бульон барботировали в течение 10 мин, 30 мин, 2 ч с момента достижения бактериальной культурой стационарной фазы или с начала и на протяжении всего процесса выращивания (18–20 ч). Затем импинжер помещали на сутки в термостат при 28 °С и делали из бульона высевы на 3 чашки с агаризованной питательной средой. Чашки инкубировали в течение 2 сут при 28 °С и еще 2 сут при комнатной температуре, ежедневно просматривая на наличие характерных колоний тест-культуры. Каждую из проб воздуха отбирали и исследовали четырехкратно.

Контролирующие приборы, культуральный сосуд, инокулятор и пробоотборник, а также система очистки воздуха помещены в бокс безопасности. Вне бокса безопасности расположены вакуумный насос, емкости с корректирующими растворами, магнитный привод и блок управления процессом культивирования.

Установка работает следующим образом. Культуральный сосуд заполняют питательной средой с инокулятом за счет разницы давления между культуральным сосудом и инокулятором, создаваемой с помощью вакуумного насоса. Для этого открывают клапаны 22 и 24, а клапан 23 оставляют закрытым. С помощью регулирующего устройства 33 на трубке 34 фильтра 32 перекрывают поступление воздуха из внутреннего пространства бокса безопасности 29, повышая таким образом разрежение в культуральном сосуде. После перекачивания инокулята в культуральный сосуд клапан 22 закрывают, а регулирующее устройство приводят в исходное положение (от-

крывают). Затем в культуральный сосуд подают воздух, который стерилизуется, проходя через фильтр 28. Для обеспечения биологической безопасности расход воздуха, подаваемого компрессором и откачиваемого вакуумным насосом, регулируют таким образом, чтобы разрежение в полости культурального сосуда в процессе работы поддерживалось на уровне 5 мм водяного столба. С помощью термостатирующего устройства и рН-метра задают необходимые значения температуры и рН. Контроль рН внутри сосуда осуществляют с помощью рН-электрода, сигнал с которого подается на перистальтический насос для подачи корректирующих растворов (0,1 М растворы соляной кислоты или гидрата окиси аммония), согласно заданным параметрам. Перемешивание бульонной культуры производят, включая магнитный привод мешалки.

Отбор проб воздуха осуществляют аспирационно-сорбционным методом, причем в импинжер воздух поступает за счет вакуумного насоса 21 при изменении положения клапанов 37, 38 и 39. Воздух барботируют через питательный бульон, открывая клапаны 37, 38 при закрытом клапане 39.

Отбор проб бульонной культуры осуществляют путем открытия клапана 23 и закрытия клапана 24, а также за счет перераспределения потоков воздуха, откачиваемого из полости культурального сосуда и бокса безопасности, перекрывая регулирующее устройство 33 на трубке 34 фильтра 32. Пробы отбирают из культурального сосуда в пробоотборник, который затем заменяют новым. После отбора проб регулирующее устройство и клапаны 23 и 24 приводят в исходное положение (клапан 24 открывают, а клапан 23 закрывают). По окончании работы аналогичным образом производят перекачивание конечного продукта (бульонной культуры), заменяя пробоотборник емкостью большего объема, отключают компрессор, перемешивающее устройство, термостатирующее устройство и рН-метр. Вакуумный насос отключают в последнюю очередь.

Находящееся внутри бокса безопасности оборудование помещают в металлические контейнеры для последующего автоклавирования. Внутренние поверхности бокса безопасности обрабатывают 4 % раствором формалина с последующей нейтрализацией его аммиаком.

В процессе экспериментальной работы установлено, что размножение индикаторного штамма *Serratia marcescens* при глубинном культивировании начиналось через 3–4 ч и продолжалось до 18–20 ч с момента посева материала. При этом максимальная концентрация биомассы (М) достигала $(5–8) \cdot 10^9$ м.к./мл, удельная скорость роста (μ) бульонной культуры составила $0,27 \text{ ч}^{-1}$, время генерации (t_d) – 2,57 ч, число клеточных делений (n) – 13,8.

Степень инактивации бактериальных аэрозолей в процессе культивирования зависела, прежде всего, от используемого дезинфицирующего средства и его концентрации. Оказалось, что в регламентирующих

Эффективность инактивации бактериальных аэрозолей в установке для культивирования микроорганизмов при выращивании *S. marcescens*

Продолжительность барботирования воздуха через контрольный бульон	Объем прокаченного воздуха, л	Используемый дезинфектант								
		хлорамин, %			перекись водорода, %			формалин, %		
		3	6	10	3	6	10	3	6	10
10 мин	10	100*	100	75	100	75	75	100	25	0
30 мин	30	100	100	75	100	75	75	100	25	0
2 ч	120	100	100	100	100	100	100	100	50	0
18–20 ч	1080–1200	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Обозначения: *) – число проб (в %), в которых обнаружена индикаторная культура; (-) – исследования не проводились.

действующими документами концентрация ни одно из испытанных дезинфицирующих средств не обеспечивало надежной защиты окружающей среды от бактериальных аэрозолей (таблица).

Используемый в виде 3 и 6 % раствора хлорамин не проявлял стерилизующего эффекта, и бактерии чудесной палочки обнаруживали во всех исследуемых пробах независимо от продолжительности барботирования воздуха через контрольный бульон. С увеличением концентрации хлорсодержащего реагента до 10 % бактерии не обнаруживали лишь в отдельных пробах, через которые воздух барботировали в течение 10 и 30 мин. При увеличении объема прокачиваемого воздуха индикаторную культуру удавалось выделить из всех четырех отобранных проб контрольного бульона.

Подобные результаты получены при оценке антибактериальной активности перекиси водорода. Разница заключалась лишь в том, что 6 % раствор этого дезинфектанта, по сравнению с хлорамин, обладал более выраженным антибактериальным действием в отношении штамма *S. marcescens*. Оснащение очистной системы установки дополнительной емкостью с любым из двух испытанных дезинфицирующих растворов в 10 % концентрации не обеспечивало полной инактивации бактериальных аэрозолей, хотя до половины сокращало число проб, из которых удавалось выделять индикаторную культуру.

Из трех испытанных дезинфицирующих средств наиболее перспективным оказался формалин. Несмотря на то, что в 3 % концентрации этот препарат не проявлял выраженной антибактериальной активности на аэрозоли, двукратное увеличение в растворе действующего вещества приводило к тому, что, по крайней мере, у половины из исследованных проб обнаружить индикаторную культуру не удавалось. А при сокращении времени барботирования воздуха от 2 ч до 30 и 10 мин бактерии выделяли лишь из каждой четвертой отобранной пробы контрольного бульона. Более того, 10 % раствор формалина уже при комнатной температуре (20–25 °С) обладал выраженным стерилизующим эффектом, что приводило к полной инактивации бактериальных аэрозолей на протяжении всего процесса культивирования. Аналогичные данные получены при проведении ограниченных опытов с 10 % формалином

на вакцинном штамме чумного микроба, в результате которых иерсинии так же не удавалось выделять из проб контрольного бульона при барботировании воздуха в течение 18–20 ч.

Известно, что для обеззараживания биологических и иных объектов используют различные дезинфицирующие вещества, обозначенные в нормативных документах [1]. Перечень конкретных дезинфектантов по отношению к объектам, концентрация, норма расхода и способ применения определяются биологическими свойствами микроорганизма и, в первую очередь, его способностью к спорообразованию в неблагоприятных условиях окружающей среды. Продолжительность обеззараживания инфицированных объектов, согласно нормам, составляет не менее 15–30 мин, достигая в некоторых случаях 48 ч. Однако при барботировании воздуха, содержащего бактериальные частицы, контакт между микробной клеткой в очистной системе и дезинфицирующим средством в силу технологических особенностей существенно ниже указанного интервала времени. Именно это обстоятельство, по-видимому, объясняет в большинстве случаев низкую антибактериальную эффективность используемых дезинфектантов. С другой стороны, несмотря на кратковременное воздействие на клетки, 10 % раствор формалина обеспечивал высокую защитную эффективность установки на протяжении всего биотехнологического цикла. Можно предполагать, что в этих случаях полная инактивация бактерий достигалась главным образом за счет высокой, по сравнению с хлорамин и перекисью водорода, летучести формалина, пары которого воздействовали на бактерии внутри трубопроводов за пределами очистной системы установки. Вместе с тем содержание формалина (по формальдегиду) в очистной системе установки в начале и в конце культивирования практически не изменялось.

Таким образом, использование ферментеров, помещенных в бок безопасности и оснащенных вакуумным насосом, герметичными клапанами трубопроводов, а также системой очистки отработанного воздуха, состоящей из последовательно соединенных емкостей с 10 % раствором формалина, обеспечивает высокую степень биологической безопасности и может быть рекомендовано для глубинного выращивания микроорганизмов различной степени патогенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03. М.: Минздрав России; 2003.
2. Бондаренко А.Ф., Родичкин В.И. Аппарат для суспензионного выращивания культур клеток. Патент RU 1405296 С. Оpubл. 1995.07.09.
3. Владимцева И.В., Самыгин В.М., Жога Л.К. и др. Установка для культивирования микроорганизмов. – Патент на изобретение № 2292387 по заявке № 2005108254 RU 2 292 387 С2 С12М 1/00 (2006.01) С12М (2006.01). Оpubл. 27.01.2007. Бюлл. № 3.
4. Инструкция по эксплуатации установки Bioflo, model C 30, фирмы «Bgunswick», США, 1976.
5. Корнеев А.Д., Алибеков К.Б., Жженова А.В. и др. Способ культивирования микроорганизмов и аппарат для его осуществления. Патент RU 2008347 С1. Оpubл. 1994.02.28.
6. Марквичев Н.С., Коростелев В.В., Манаков М.Н. и др. Установка для культивирования клеток или микроорганизмов. – Патент RU 2005778 С1. Оpubл. 1994.01.15.
7. Нестеров Б.Ф., Смолин Б.И., Горячев В.В. Установка для культивирования микроорганизмов. А.с. СССР 1143774 А. Оpubл. 07.03.85. Бюлл. № 9
8. Самыгин В.М., Владимцева И.В., Гришкина Т.А. и др. Конструкция установки для глубинного культивирования аэробных патогенов. Биотехнология. 2008; 2:65–8.

Об авторах:

Самыгин В.М., Александров А.Ю., Редкозубов С.В., Нгуен Тхи Нгок Минь. Волгоградский государственный технический университет. 400131, Волгоград, пр. Ленина, 28. Тел.: (844-2) 23-00-76. E-mail: rector@vstu.ru

Гришкина Т.А., Жога Л.К. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел.: (844-2) 37-37-74. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

V.M.Samygin, T.A.Grishkina, L.K.Zhoga, A.Yu.Alexandrov,
S.V.Redkozubov, Nguen Tkhi Ngok Min

System of Environmental Protection from Bacterial Aerosols in Propagators for Microorganisms Cultivation

*Volgograd State Technical University;
Volgograd Anti-Plague Research Institute*

Presented is propagator equipped with environmental protection system against fermentation releases. The unit supplied with vacuum pump, airproof pipeline valves and a series of sequentially connected tanks with disinfectant solutions is placed in a safety box. Shown are the experimental data on comparative evaluation of inactivation properties of authorized decontamination materials as for bacterial aerosols at submerged cultivation of germs.

Key words: bacterial aerosol, propagator, safety system, biological safety.

Authors:

Samygin V.M., Alexandrov A.Yu., Redkozubov S.V., Nguen Tkhi Ngok Min. Volgograd State Technical University. 400131, Volgograd, Pr. Lenina, 28. E-mail: rector@vstu.ru
Grishkina T.A., Zhoga L.K. Volgograd Anti-Plague Research Institute. 400131, Volgograd, Golubinskaya St., 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 13.03.09.