



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МИКРООРГАНИЗМА *PAENIBACILLUS EHIMENSIS* IB 739 И ПРЕПАРАТА БАЦИСПЕЦИН БМ

Рафикова Г.Ф., Кузина Е.В., Логинов О.Н.

Уфимский Институт биологии Уфимского
федерального исследовательского центра РАН, Уфа,
E-mail: biolab316@yandex.ru

Целью данного исследования явилась экспериментальная оценка токсичности и опасности как регулятора роста растений Бациспектин БМ и его действующего начала – микробного штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739. Установлено, что микробный штамм не вирулентен, не токсичен, не обладает токсигенностью, способностью к диссеминации, не оказывает существенного дисбиотического действия на микрофлору организма. Проявляет иммуномодулирующее влияние и слабовыраженные аллергенные свойства. Местный раздражающий эффект на конъюнктиву и кожные покровы отсутствует. Микробиологический препарат Бациспектин БМ по параметрам острой токсичности и опасности является малоопасным и относится к продуктам 4-го класса опасности. Местное раздражающее влияние на кожу и слизистые оболочки глаз не проявляется. Кожно-резорбтивное действие слабо выражено. Обладает иммуномодулирующим влиянием и слабовыраженной аллергенной активностью. Не проявляет дисбиотического влияния на микрофлору кишечника. На основании экспериментальных данных установлено, что лимитирующим критерием вредного действия на организм теплокровных животных, как штамма-продуцента, так и препарата на его основе, является слабовыраженная аллергическая активность. Результаты проведенных исследований дают основание заключить, что препарат Бациспектин БМ не имеет медико-гигиенических противопоказаний к использованию в сельском хозяйстве в качестве регулятора роста растений.

Ключевые слова: *Paenibacillus ehimensis* IB 739, регулятор роста растений Бациспектин БМ, токсикологическая оценка, острая токсичность, раздражающее действие, иммуномодулирующее действие, аллергическая активность

TOXICOLOGICAL ESTIMATION OF MICROORGANISM *PAENIBACILLUS EHIMENSIS* IB 739 AND PREPARATION BACISPETSIN BM

Rafikova G.F., Kuzina E.V., Loginov O.N.

Ufa Institute of biology of the Ufa Federal Research
Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: biolab316@yandex.ru

The purpose of this study was an experimental assessment of the toxicity and hazard of plant growth regulator Bacispecin BM preparation and its active ingredient, the microbial strain *Paenibacillus ehimensis* IB 739. It was found that the microbial strain is not virulent, non-toxic, toxigenic, the ability to disseminate, does not have a significant dysbiotic effect on the microflora of the body. Has immunomodulatory effects and mild allergenic properties. Local irritant effect on the conjunctiva and skin is absent. The microbiological preparation Bacispecin BM on the parameters of acute toxicity and danger is of low danger and belongs to the products of the 4th hazard class. Local irritant effect on the skin and mucous membranes of the eyes is not manifested. The skin-resorptive effect is poorly expressed. Has immunomodulating effect and mild allergenic activity. Does not show a dysbiotic effect on the intestinal microflora. On the basis of experimental data, it has been established that low-grade allergic activity is the limiting criterion for the harmful effect on the body of warm-blooded animals, both the producer strain and the drug on its basis. The results of the studies lead to the conclusion that the preparation Bacispecin BM does not have medical and hygienic contraindications to use in agriculture as a regulator of plant growth.

Keywords: *Paenibacillus ehimensis* IB 739, plant growth regulator Bacispecin BM, toxicological assessment, acute toxicity, irritant effect, immunomodulatory effect, allergic activity

Поступила в редакцию: 26.04.2018

DOI: [10.31163/2618-964X-2018-1-2-63-70](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2018-1-2-63-70)

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день для повышения урожайности сельскохозяйственных культур и качества растениеводческой продукции наряду с созданием новых высокопродуктивных сортов растений, разработками более современной системы организационных и агротехнических мероприятий, включающих использование традиционных средств - минеральных и органических удобрений, средств защиты растений - большое значение имеет и применение регуляторов роста растений.

Регуляторы роста растений используют для повышения всхожести и энергии прорастания семян, увеличения устойчивости к неблагоприятным условиям роста и стрессовым ситуациям, повышения иммунитета растений, ускорения цветения и плодоношения, повышения урожайности. Кроме того, внедрение в технологию возделывания культур регуляторов роста растений позволяет обеспечить экологическую чистоту урожая, что, в первую очередь, связано со снижением доли использования химических пестицидов.

Среди широкого спектра современных регуляторов роста растений наибольший интерес представляют препараты, которые оказывают не только ростстимулирующее, но и защитное действие на растения. Таким препаратом комплексного действия является микробный регулятор роста растений Бациспектин БМ, разработанный в Уфимском Институте биологии УФИЦ РАН. В состав биопрепарата входят клетки и споры штамма бактерий *Paenibacillus ehimensis* IB 739. Микроорганизм стимулирует рост и развитие растений за счет синтеза фитогормональных веществ – цитокининов; проявляет антагонистическую и литическую активность в отношении некоторых видов фитопатогенных грибов за счет продукции им комплекса внеклеточных ферментов – β -1,3-глюканазы, хитиназы, хитозаназы – воздействующих на клеточную стенку микромицетов [Мелентьев и др., 1994; Мелентьев и др., 2003]. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ В-2680D.

Для возможности широкого применения регуляторов роста растений в растениеводстве необходимо проведение токсиколого-гигиенической оценки как самого препарата, так и составляющего его основу штамма микроорганизмов.

Целью исследования явилась оценка патогенности бактериального штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739, а также токсичности и опасности самого препарата Бациспектин БМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм микроорганизмов *Paenibacillus ehimensis* IB 739 выделен из образца пахотных земель (выщелоченный чернозем) с. Булгаково Уфимского района Республики Башкортостан, не является генетически модифицированным штаммом.

Клетки представляют собой грамположительные подвижные палочки размером 0,3-0,5×1,7-4,2 мкм. Споры эллиптические, спорангий раздувают, расположены терминально. На агаризованной среде с крахмалом (К1) на 1 сутки образуется 2 типа колоний: одни кремовые, другие – чуть более темные, все колонии полупрозрачные, овальные, диаметром 2-4 мм, гладкие, равномерно выпуклые, блестящие, с ровным краем, однородные. По отношению к кислороду - аэроб. Хорошо растет в интервале температур от 30 до 45°C. Усваивает глюкозу,

сахарозу, арабинозу, маннит, глицерин, этанол. При сбраживании сахаров газ не образуется, кислота выделяется. Гидролизует крахмал. В качестве источника азота усваивает как органические формы (пептон, автолизаты, экстракты), так и минеральные (соли аммония, нитраты). Реакция Фогес-Проскауэра (образование ацетилметилкарбинола) отрицательная. Тирозин не разлагает. Дезаминирование фенилаланина не происходит. Не растет в присутствии 7% NaCl. Растет при pH 9. Проявляет гемолитическую активность – β гемолиз, кислород независимого типа. На среде с крахмалом образует кристаллы циклодекстринов. На средах с хитином синтезирует хитиназу и хитозаназу.

Биопрепарат Бациспектин БМ представляет собой порошок, в состав которого входит штамм *Paenibacillus ehimensis* IB 739 с титром не менее 2×10^8 КОЕ/г, остатки питательной среды, прилипатель и наполнитель.

Токсикологическая оценка штамма и препарата на его основе проведена согласно методическим указаниям [Критерии оценки..., 1992; Методические указания ..., 1982; Методические указания ..., 1991].

Вирулентность микробного штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 оценивалась в острых опытах на белых мышах и крысах при различных путях введения взвеси бактерий в физиологическом растворе: внутрибрюшинно, перорально и интраназально.

Токсичность штамма определялась на мышах внутрибрюшинным введением культуры в различных дозах.

Токсигенность штамма оценивалась путем внутрибрюшинного и перорального введения белым мышам фильтратов экзотоксина, получаемых путем фильтрования через бактериальные фильтры 3-х и 7-и суточных бульонных культур. Наблюдение за животными велось в течение 15 дней.

Оценка способности исследуемого штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739 к диссеминации в организме проводилась на белых мышах при однократном и крысах - продолжительном, в течение одного месяца введении *per os* взвеси суточной культуры штамма в физиологическом растворе. Доза микроорганизмов для однократного введения соответствовала максимальной дозе, не вызывавшей гибели животных при оценке вирулентности штамма – 10^9 КОЕ/мл. При этом мышам данная доза вводилась в 2 приема: по 0,5мл с промежутком в 2,5 часа - в виду ограниченности объема желудка. В исследовании способности данного штамма к диссеминации на крысах при месячном ежедневном пероральном введении культуры штамма были испытаны две дозы 10^9 и 10^7 КОЕ/мл. Функциональное состояние органов и систем животных оценивалось с учетом показателей массы тела и внутренних органов, а также поведенческих реакций.

Для оценки иммунотоксического влияния штамма были проведены исследования на мышах и морских свинках. Возможность развития сенсibilизации организма и формирования состояния гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) выявлялась на белых мышах посредством сенсibilизации в корень хвоста взвесью микроорганизмов физиологическом растворе в концентрации 10^9 КОЕ/мл в объеме 0,02 мл; контрольным мышам в том же объеме вводился физиологический раствор. Разрешающая доза инъецировалась на 5-ые сутки в подушечки задних лапок.

Сенсibilизация морских свинок осуществлялась посредством трехкратного подкожного введения с интервалом в 3 дня 0,02 мл взвеси культуры в физ. растворе с титром микроорганизмов 10^9 КОЕ/мл. Обследование животных выполнялось через 14 дней после

последней инъекции культуры: ставились кожные пробы, определялись показатели реакции специфической агломерации лейкоцитов (РСАЛ), относительного содержания розеткообразующих клеток (РОК), реакции дегрануляции тучных клеток (РДТК).

Местное раздражительное действие бактерий на кожу оценивалось на морских свинках. Животным трехкратно наносилось и втиралось стеклянной палочкой 4 капли односуточной культуры штамма в физиологическом растворе в концентрации 10^9 КОЕ/мл. Контрольным животным наносился физиологический раствор.

Местное раздражительное действие на конъюнктиву испытывалось путем ежедневного (на протяжении трех дней) однократного внесения двух капель взвеси суточной культуры штамма в физиологическом растворе в концентрации 10^9 КОЕ/мл. Контрольным животным вносился физиологический раствор.

Возможность кожно-резорбтивного влияния продуктов жизнедеятельности штамма оценивалось в двухнедельном опыте на белых мышах пробирочным методом. Испытывалась суспензия в физиологическом растворе суточной культуры в концентрации 10^9 КОЕ/мл, ежедневная экспозиция составляла 2 часа.

Токсичность препарата при однократном введении *per os* определялась на двух видах лабораторных животных: беспородных белых крысах и мышах.

Препарат вводился в виде 50%-ной водной пасты. Испытанные дозы по порошку Бациспектин БМ, П составляли 1, 3, 5 г/кг массы тела.

Острая ингаляционная токсичность препарата оценивалась на беспородных белых крысах (4-х часовая ингаляция) и белых мышах (2-х часовая ингаляция), помещенных в индивидуальные домики.

Местное раздражающее влияние препарата на кожные покровы изучалось при однократном и повторном, в течение 10 дней, воздействии продукта в виде аппликаций 50%-ной водной пасты на кожу хвоста белых мышей, а также на морских свинках при нанесении на выстриженный участок кожи боковой поверхности туловища ежедневно в объеме 1 мл.

Местное действие на конъюнктиву глаз кроликов изучалось при однократном внесении 1 капли 50%-ной водной пасты препарата при наблюдении в течение 2 недель.

Кожно-резорбтивное действие биопрепарата испытывалось в 2-х недельном опыте на белых мышах посредством обертывания хвоста кусочком вощаной бумаги с нанесением на него 50% водной пастой продукта. Экспозиция составляла 2 часа с последующим обмыванием кожи хвоста водой.

Влияние биопрепарата на иммунную систему по тесту ГЗТ оценивалось на белых мышах. Животные сенсибилизировались 100 мкг препарата в ПАФ (полный адъювант Фрейнда).

Морские свинки сенсибилизировались комплексным методом: 200 мкг препарата в физиологическом растворе было введено однократно внутрикожно по методу Алексеевой-Петкевич; с 11-го дня сенсибилизации было накожно выполнено 10 аппликаций 50 % водной пасты биопрепарата в количестве 4 капель ежедневно.

Кумулятивные свойства препарата изучались на белых крысах при ежедневном пероральном введении 30%-ной водной взвеси в дозе 1,0 г/кг массы тела по препарату. Продолжительность опыта составляла 2 месяца. Суммарная получаемая доза препарата 40 г/кг массы тела.

Дисбиотическое действие препаративной формы Бациспектин БМ исследовалось в месячном эксперименте с энтеральным введением препарата беспородным белым крысам в суммарной дозе 20 г/кг массы тела. По окончании экспозиции исследовался микробиоценоз кишечника путем высева фекалий на различные селективные и дифференциально-диагностические питательные среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Токсикологическая оценка микроорганизма *Paenibacillus ehimensis* IB 739.

Вирулентность. Результаты изучения вирулентности штамма на подопытных животных при различных способах введения в организм, показали, что смертности среди животных обоих видов не зарегистрировано. При внутрибрюшинном введении величина lg DL₅₀ микробного штамма превышает «6» для мышей и «7» для крыс; при пероральном введении превышает «9», при интраназальном «7», что позволяет отнести изучаемый штамм к группе не вирулентных.

Токсичность. Значение DL₅₀ убитой культуры штамма при внутрибрюшинном введении, выраженное в lg, превышает «9», что позволяет отнести штамм *Paenibacillus ehimensis* IB 739 к группе не токсичных микроорганизмов.

Токсигенность. При внутрибрюшинном и пероральном введении фильтратов трех- и семисуточных бульонных культур токсигенные свойства штамма не были выявлены. DL₅₀ для трехсуточной культуры внутрибрюшинно >1,5; Per os >2,0; для семисуточной соответственно >1,3 и >1,8.

Диссеминация. Было установлено, что однократное пероральное введение максимальной испытанной при определении вирулентности дозы суточной культуры штамма 10⁹ КОЕ/мл - не сопровождается диссеминацией микроорганизмов во внутренние органы (кровь, сердце, легкие, печень, почки, селезенка) и не вызывает развития в организме функциональных сдвигов. Повторное 20-кратное введение бактерий на протяжении одного месяца также не приводило к диссеминации штамма во внутренние органы.

Действие на иммунную систему. Все микроорганизмы, как чужеродная для макроорганизма белковая субстанция, представляют собой аллергены; однако степень выраженности их влияния на иммунную систему различна. При изучении влияния штамма на иммунологические показатели у подопытных мышей (степень развития ГЗТ по отеку лапок) достоверного повышения индекса реакции у опытной группы животных по сравнению с контрольной не установлено.

Кожные пробы у морских свинок оказались отрицательными. Однако выявлено иммуномодулирующее влияние штамма, о чем свидетельствуют сдвиги относительного содержания разных классов лимфоцитов. Наибольшие сдвиги относительно величин физиологической нормы были характерны для показателей Т- и О-лимфоцитов; содержание же В- и В_{ал}-лимфоцитов было близко к верхней границе физиологических значений. Повышенной оказалась реакция тучных клеток (РДТК) на микробный штамм у 37,5% подопытных животных при 0% реакции в контрольной группе. Все это позволяет расценить изучаемый штамм *Paenibacillus ehimensis* IB 739 как слабый аллерген.

Местное раздражающее влияние штамма на кожу и конъюнктивальную оболочку. Визуальное наблюдение за состоянием эпидермиса на участке аппликаций велось в течение одного месяца. При этом каких-либо заметных признаков воспалительной реакции не зарегистрировано. Повторные аппликации культуры в течение двух недель в той же концентрации не вели к возникновению местных визуально заметных изменений кожных покровов. При визуальном наблюдении за состоянием слизистой оболочки глаз кроликов каких-либо признаков воспалительной реакции не отмечено. Следовательно, штамм *Paenibacillus ehimensis* IB 739 не обладает местным раздражающим эффектом на кожу и конъюнктиву.

Кожно-резорбтивное действие. Случаев гибели животных, либо заметных признаков изменения их состояния не отмечено. Различий по поведенческим реакциям и температуре тела животных между опытными и контрольными группами не выявлено. В конце опыта обнаружилось снижение коэффициентов относительной массы сердца, легких, надпочечников, относительной массы печени. Вместе с тем, обращает на себя внимание тенденция к возрастанию показателей массы тела у подопытных мышей по сравнению с контрольными.

Возможно, продукты жизнедеятельности *Paenibacillus ehimensis* IB 739, придающие штамму и препарату на его основе биостимулирующие свойства, обладают способностью к кожной резорбции и определенному влиянию на обменные процессы организма экспериментальных животных.

Токсикологическая оценка препарата Бациспектин БМ.

Острая пероральная токсичность. Клинические проявления действия препарата выражались в развитии двигательной заторможенности животных непосредственно после введения пасты препарата. Наибольшая двигательная заторможенность отмечалась при использовании максимальной дозы (5 г/кг массы тела животного).

На следующие сутки общее состояние и поведение животных нормализовалось. Гибели животных особых видов в течение 30 дней не отмечалось.

Эти результаты позволяют оценить микробиологический препарат Бациспектин БМ как малотоксичный и малоопасный при однократном энтеральном поступлении в организм в условиях производства, а также при использовании в качестве агрохимиката.

Острая ингаляционная токсичность. Средняя концентрация аэрозоля препарата в камере, рассчитанная весовым методом, определена на уровне 57725 мг/м³. Случаев гибели животных на протяжении 30-дневного периода наблюдения не отмечено.

Выполненное исследование позволяет оценить препарат Бациспектин БМ как малотоксичный и малоопасный продукт при однократном ингаляционном воздействии на организм в условиях производства (4 класс опасности).

Местное раздражающее влияние штамма на кожу и конъюнктивальную оболочку. Было установлено, что как однократный, так и повторные контакты продукта с кожей не оказывают заметного раздражительного эффекта.

Исследование местного действия на конъюнктиву глаз не выявило заметного раздражающего влияния препарата Бациспектин БМ.

Кожно-резорбтивное действие. Гибели животных, либо изменений их общего состояния и поведения не отмечалось. Результаты опытов по кожно-резорбтивному действию препаративной формы были аналогичными результатам тестов с использованием в качестве объекта исследований штамма *Paenibacillus ehimensis* IB 739: коэффициенты относительной массы внутренних органов уменьшались, что, вероятно может быть связано со статистически значимым увеличением привесов у экспериментальных животных, по сравнению с контролем. Полученные результаты не исключают кожную резорбцию компонентов препарата.

Сенсибилизирующее действие. Достоверных отличий от контроля по тесту ГЗТ не выявлено.

Кожные тесты через 24 и 48 часов постановки оказались положительными у 20-30% животных опытной группы: их интенсивность составляла 1 балл. У контрольной группы морских свинок не отмечено положительной реакции на препарат.

Относительное содержание розеткообразующих клеток изменилось по сравнению с контролем: достоверно снизился процент Т-лимфоцитов, возросла доля О-клеток; содержание В- и В_{all}-клеток соответствовало верхней границе физиологических значений для морских свинок [Дуева и др., 1982]. Возросли активность клеточных иммунных реакций по показателю РСАЛ, а также выраженность гуморальной фазы аллергической перестройки организма по уровню РДТК.

При обобщении результатов исследований по влиянию препарата Бациспектин БМ на иммунологические показатели подопытных животных были установлены иммуномодулирующее действие и аллергенная активность.

По степени выраженности сдвигов и выявлении их при использовании разных иммунологических тестов Бациспектин БМ может быть оценен как препарат, обладающий слабовыраженной аллергенной активностью [Методические указания ..., 1982; Требования..., 1996].

Кумулятивные свойства. Гибели животных и каких-либо существенных признаков нарушения их общего состояния не отмечено. К концу двухмесячной экспозиции отмечено небольшое снижение числа эритроцитов в крови подопытных животных, не выходящее за пределы физиологических колебаний показателя, некоторое повышение уровня креатинина в сыворотке крови и снижение коэффициента относительной массы надпочечников, не выходящее за пределы физиологических значений. Другие функциональные показатели не отличались существенно у подопытных и контрольных животных. Выявлен более значительный прирост массы тела в группе, получавшей препарат. $K_{\text{кум}}$ более 5. Эти данные согласуются с данными, полученными при изучении кожно-резорбтивного влияния, и, как представляется, связаны с биостимулирующей активностью препарата.

Дисбактериотическое действие. Бактериологические исследования микрофлоры кишечника показали, что при внутрижелудочном поступлении в организм препарата Бациспектин БМ в течение 1 месяца не происходит значимого изменения (дисбаланса) микробиоценоза кишечника крыс.

Таким образом, на основании полученных данных установлено, что лимитирующим критерием вредного действия на организм теплокровных животных, как штамма-продуцента, так и препарата на его основе, является слабовыраженная аллергическая активность. Регулятор роста растений Бациспектин БМ не имеет медико-гигиенических

противопоказаний к использованию в сельском хозяйстве в качестве агрохимиката при соблюдении персоналом, контактирующим с препаратом, санитарно-гигиенических норм, использовании средств индивидуальной защиты и исключения допуска к работе с препаратом людей, склонных к аллергическим реакциям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дуева Л.А. Чмут В.Г., Хилько Т.Ф. Комплекс тестов розеткообразования для изучения реагирования организма на воздействие химических соединений в эксперименте на морских свинках // Гигиена труда и профзаболевания. 1982. № 9. С. 24-27.
2. Критерии оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза. Методические рекомендации. М., 1992. 22 с.
3. Мелентьев А.И., Усанов Н.Г., Логинов О.Н.. Штамм бактерий *Bacillus* sp. для получения препарата против грибных возбудителей болезней злаковых культур. Патент РФ № 1743019. Заявл. 03.10.1989. Оpubл. 30.05.1994.
4. Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э., Усанов Н.Г., Кузьмина Л.Ю. Продуцент комплекса хитинолитических ферментов и ламинариказы Патент РФ № 2213773. Заявл. 27.11.2001. Оpubл. 10.10.2003. Бюл. № 28.
5. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих бактерий. № 2620-82 от 22.09.82.
6. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды. № 5789/1-91 от 11.06.91.
7. Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы. Методические указания. № 1.1.0578-96.