

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ РОЛИ В РАБОЧЕМ ПРОЦЕССЕ

Колохина Анна Александровна

Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)

akolokhina@mail.ru

IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS OF THE PRODUCTION ENVIRONMENT AND THE STUDY OF THEIR ROLE IN THE WORK PROCESS

A. Kolokhina

Summary: Identification of microorganisms is an integral stage of work when taking into account the results of microbiological monitoring of the production environment. The goal is to study the role of microorganisms isolated from the production environment in the work process. In the course of the study, two types of identification were used: the API microorganism identification system and the automatic bacteriological analyzer Vitek 2 Compact. As a result of the work carried out, a bank of 12 microorganisms with biotechnological potential was created. Microorganisms included in the bank show properties that can be used to create medicines and diagnostics, improve the taste properties of products, increase the productivity of plants and animals, as well as clean up soil and wastewater from enterprises. The analysis of microorganisms isolated from the production environment makes it possible to reduce the risks of contamination of finished products, test the growth properties of nutrient media, conduct tests for antimicrobial properties, determine the effectiveness of disinfectants, validate and verify production and laboratory processes together with reference strains.

Keywords: identification of microorganisms, automatic bacteriological analyzer Vitek 2 Compact, API microorganism identification systems.

Аннотация: Идентификация микроорганизмов является неотъемлемым этапом работы при учёте результатов микробиологического мониторинга производственной среды. Цель — изучение роли микроорганизмов, выделенных из производственной среды в рабочем процессе. В ходе исследования применялись два вида идентификации: системы идентификации микроорганизмов API и анализатор автоматический бактериологический Vitek 2 Compact. В результате проведенной работы был создан банк из 12 микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом. Входящие в банк микроорганизмы проявляют свойства, которые могут быть применены с целью создания лекарственных средств и диагностикумов, улучшения вкусовых свойств продуктов, повышения продуктивности растений и животных, а также очистки почв и сточных вод с предприятий. Анализ микроорганизмов, выделенных из производственной среды, позволяет снизить риски контаминации готовой продукции, тестировать ростовые свойства питательных сред, проводить тесты на антимикробные свойства, определять эффективность дезинфицирующих средств, валидировать и верифицировать производственные и лабораторные процессы совместно с эталонными штаммами.

Ключевые слова: идентификация микроорганизмов, автоматический бактериологический анализатор Vitek 2 Compact, системы идентификации микроорганизмов API.

Введение

На данный момент практикуется активное использование микроорганизмов в различных областях промышленности для решения задач, которые стоят перед человечеством. С помощью микроорганизмов борются с заболеваниями человека, животных и растений, увеличивают выработку продукта, перерабатывают отходы, создают функциональные продукты питания.

Полученные нами данные представляют, как теоретическую, так и практическую значимость. Результаты исследований можно применять для изучения и внедрения микроорганизмов в промышленное производство. Полученные нами микроорганизмы могут быть применены с целью создания лекарственных средств и диагностикумов, улучшения вкусовых свойств продуктов, повышения продуктивности растений и животных, а также очистки почв и сточных вод с предприятий.

Материалы и методы

Микроорганизмы были выделены из производственной среды в ходе микробиологического мониторинга.

Применялись методы: аспирация воздуха, седиментация воздуха, отпечаток с поверхности контактной пластиной, смыв с поверхности. Также микроорганизмы были получены в ходе регистрации результатов несоответствующих нормативной документации. Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 Compact и системы идентификации микроорганизмов API.

Результаты и обсуждения

За период с октября 2021 года по апрель 2023 года было проведено 724 идентификации микроорганизмов, выделенных из производственной среды ООО «Спутник Технополис». Результаты проведенных идентификаций представлены в таблице 1.

В ходе проведенного анализа были определены источники получения диких штаммов микроорганизмов. Основным источником контаминации является человек (67 % от всех идентификаций), второе по распространенности место занимает вода (19 %), небольшой процент микроорганизмов был выделен из воздуха (10 %) и материалов (4%).

Таблица 1.
Сводная таблица данных по идентификации
микроорганизмов за период
октябрь 2021 г. — апрель 2023 г.

Род	Вид	Количество идентификаций
Achromobacter	xylooxidans	1
Acinetobacter	lwoffii	1
Aerococcus	viridans	1
Alicyclobacillus	acidoterrestris	7
Alloiococcus	otitis	1
Aneurinibacillus	aneuriniticus	2
Aeribacillus	pallidus	1
Bacillus	cereus	51
	farraginis	3
	firmus	3
	licheniformis	10
	lentus	3
	megaterium	8
	mycoides	17
	pumilus	7
	circulans	5
	simplex	3
	smithii	2
	sporothermodurans	1
	subtilis	17
	thermoamylovorans	1
thuringiensis	2	
Brevibacillus	choshinensis	6
	laterosporus	6
Burkholderia	cepacia gr.	1
	gladioli	1
Chromobacterium	violacium	2
Comamonas	testosteroni	2
Corynebacterium	jeikeium	1
Cronobacter	sakazakii group	1
Dermacoccus	nishinomiyaensis	3
Elizabethkingia	meningoseptica	3
Enterobacter	aerogenes	1
	cloacae complex	16
Ewingella	americana	1
Geobacillus	stearothermophilus	4
Granulicatella	adiacens	2
Klebsiella	pneumoniae	2

Род	Вид	Количество идентификаций
Kocuria	kristinae	10
	rhizophila	6
	rosea	6
	varians	2
Lysinibacillus	fusiformis	1
	sphaericus	1
Micrococcus	luteus	46
	lylae	5
	ssp.	18
Ochrobactrum	anthropi	2
Paenibacillus	amyolyticus	2
	durus	1
	thiaminolyticus	1
Pantoea	spp.	19
Pseudomonas	fluorescens	4
	putida	3
	stutzeri	1
Ralstonia	insidiosa	56
	pickettii	15
	mannitolilytica	2
Raoultella	ornithinolytica	1
Rhodotorula	glutinis	3
Sphingomonas	thalpophilu	1
	spiritivorum	1
	paucimobilis	23
Staphylococcus	epidermidis	88
	hominis	47
	vitulinus	2
	warneri	35
	arlettae	1
	capitis	9
	cohnii	6
	chromogenes	1
	haemolyticus	29
	lugdunensis	2
	lentus	2
	aureus	23
	auricularis	1
	pseudintermed	6
saprophyticus	17	
xylosus	5	
Stenotrophomonas	maltophilia	17
Vagococcus	fluvialis	1
Virgibacillus	proomii	1

Перед проведением видовой идентификации все микроорганизмы подлежат микроскопии. Чаще всего в производственной среде встречаются грамположительные кокки (51 %), второе по распространенности место занимают грамотрицательные палочки (24 %) и почти так же распространены грамположительные спорообразующие палочки (22 %), присутствуют также неспорообразующие грамположительные палочки (1 %) и грибы (2 %).

С помощью литературных данных был проведен анализ полученных микроорганизмов на патогенность. Большая часть выделенных и проидентифицированных микроорганизмов являются условно-патогенными. Условно-патогенные микроорганизмы были выделены 356 раз, что составило 49 % от общего числа идентификаций. Патогенные микроорганизмы были выделены из производственной среды 206 раз (28 %), а непатогенные — 166 раз (23 %).

В ходе проведенных исследований были определены группы микроорганизмов, выделенные более 9 раз, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Микроорганизмы, выделенные более 9 раз

Род	Вид	Количество идентификаций
Bacillus	cereus	51
	licheniformis	10
	mycoides	17
	subtilis	17
Enterobacter	cloacae complex	16
Kocuria	kristinae	10
Micrococcus	luteus	46
	spp.	18
Pantoea	spp.	19
Ralstonia	insidiosa	56
	pickettii	15
Sphingomonas	paucimobilis	23
Staphylococcus	epidermidis	88
	hominis	47
	warneri	35
	haemolyticus	29
	aureus	23
Stenotrophomonas	saprophyticus	17
	maltophilia	17

При выявлении микроорганизма десятый раз проводился анализ литературных источников на наличие биотехнологического потенциала каждого микроорганизма. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Дикие штаммы микроорганизмов, обладающие биотехнологическим потенциалом

Вид микроорганизма	Область применения
Bacillus cereus	Является стимулятором роста растений. Обладает пробиотическими свойствами. Переносит, обесцвечивает и уменьшает количество токсичных соединений, присутствующих в сточных водах [10, 11, 16, 17].=.
Bacillus licheniformis	Используется при профилактике диареи, смягчении последствий колита, профилактики и лечении пародонтита, улучшает когнитивные функции, обладает пробиотическими свойствами, обладает свойствами против ожирения и диабета, продуцирует бацитроцин. Широко используется для биодеградации отходов животноводства, обладает свойствами для очистки промышленных сточных вод [3, 5, 6, 15].
Bacillus mycoides	Стимулирует рост растений и защищает их от вредителей.
Bacillus subtilis	Обладает статусом GRAS, в связи с чем широко применяется в пищевой промышленности. Экспрессирует амилазы, ксиланазы, лихеназу, β-галактозидазу, целлюлазы, щелочные сериновые протеазы, полипептиды, бактериоцины. Участвует в биоремедиации воды. Применяется в различных областях: медицина, пищевая промышленность, сельское хозяйство, экология [1, 2, 3, 7, 8, 9, 13].
Micrococcus luteus	Участвует в трансформации органических остатков природного происхождения. Повышает урожайность сельскохозяйственных культур.
Micrococcus spp.	Снижает содержание общего азота, аммоний-иона, железа и алюминия в сточных водах.
Enterobacter cloacae complex	Увеличивает способность растений поглощать металлы. Используется для биодеградации взрывчатых веществ и в биологической борьбе с болезнями растений.
Sphingomonas paucimobilis	Разлагает феруловую кислоту, лигнин и бифенил. Биопленки могут быть полезны в борьбе с коррозией. Везикулы можно использовать для диагностики цирроза печени, рака печени, инфаркта миокарда, почечной недостаточности, диабета, опухолей головного мозга, умеренных нарушений когнитивных функций, деменции, депрессии, аутизма и атопического дерматита [5, 14].
Staphylococcus hominis	Способен продуцировать низкомолекулярные антибактериальные пептиды.
Staphylococcus warneri	Является деструктором углеводов, содержащихся в почвах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.
Stenotrophomonas maltophilia	Может быть использован как для очистки почвы, так и для очистки воды от загрязнений нефтью и нефтепродуктами (дизельное топливо, масло моторное, масло гидравлическое, газовый конденсат).

Вид микроорганизма	Область применения
<i>Pantoea</i> spp.	Способствует росту растений за счет увеличения поступления азота, растворения аммиака и неорганического фосфата и выработки фитогормонов (например, ауксинов). Также обеспечивает растения защитой от вредителей и патогенных микроорганизмов [12].

Выводы

Каждое производство обладает своим микробиологическим составом. Его важно изучать и анализировать для того, чтобы вовремя предотвращать или сводить к минимуму риски контаминации.

В ходе проведенного исследования нами был определен видовой состав производственной среды биотехнологического производства, определены источники контаминации, наиболее часто встречающиеся типы микроорганизмов, отношение выявленных микроорганизмов к патогенности.

По результатам исследований из производственной среды было выделено 12 видов диких штаммов микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом и представляющих промышленный интерес: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae* complex, *Sphingomonas paucimobilis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Pantoea* spp.

ЛИТЕРАТУРА

- Blake C., Christensen M.N., Kovács Á.T. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2021 Jan;34(1):15–25. doi: 10.1094/MPMI-08-20-0225-CR.
- Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front Microbiol.* 2019 Feb 26;10:302. doi: 10.3389/fmicb.2019.00302. PMID: 30873135; PMCID: PMC6401651.
- Elshaghabee F.M., Rokana N., Gulhane R.D., Sharma C., Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1490. doi: 10.3389/fmicb.2017.01490.
- Gudiña E.J, Teixeira J.A. *Bacillus licheniformis*: The unexplored alternative for the anaerobic production of lipopeptide biosurfactants? *Biotechnol Adv.* 2022 Nov;60:108013. doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.108013.
- Gusman V., Medic D., Jelesic Z., Mihajlovic-Ukropina M. *Sphingomonas paucimobilis* as a biofilm producer. *Archives of Biological Sciences.* 2012; 64. 1327–1331. 10.2298/ABS1204327G.
- He H., Yu Q., Ding Z., Zhang L., Shi G., Li Y. Biotechnological and food synthetic biology potential of platform strain: *Bacillus licheniformis*. *Synth Syst Biotechnol.* 2023; Mar 30;8(2):281–291. doi: 10.1016/j.synbio.2023.03.008.
- Hecker M., Völker U. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol.* 2001; 44:35–91. doi: 10.1016/s0065-2911(01)44011-2.
- Jiang S., Hu J.Y., Cheng H.W. The Impact of Probiotic *Bacillus subtilis* on Injurious Behavior in Laying Hens. *Animals (Basel).* 2022 Mar 30;12(7):870. doi: 10.3390/ani12070870.
- Jiang S., Yan F.F., Hu J.Y., Mohammed A., Cheng H.W. *Bacillus subtilis*-Based Probiotic Improves Skeletal Health and Immunity in Broiler Chickens Exposed to Heat Stress. *Animals (Basel).* 2021 May 21;11(6):1494. doi: 10.3390/ani11061494.
- Lin Y., Briandet R., Kovács Á.T. *Bacillus cereus* sensu lato biofilm formation and its ecological importance. *Biofilm.* 2022 Feb 15; 4:100070. doi: 10.1016/j.biofilm.2022.100070.
- Liu X.Y., Hu Q., Xu F., Ding S.Y., Zhu K. Characterization of *Bacillus cereus* in Dairy Products in China. *Toxins (Basel).* 2020 Jul 14;12(7):454. doi: 10.3390/toxins12070454.
- Lorenzi A.S., Bonatelli M.L., Chia M.A., Peressim L., Quecine M.C. Opposite Sides of *Pantoea* agglomerans and Its Associated Commercial Outlook. *Microorganisms.* 2022 Oct 20;10(10):2072. doi: 10.3390/microorganisms10102072.
- Lv P., Song Y., Liu C., Yu L., Shang Y., Tang H., Sun S., Wang F. Application of *Bacillus subtilis* as a live vaccine vector: A review. *J Vet Med Sci.* 2020 Dec 5;82(11):1693–1699. doi: 10.1292/jvms.20-0363.
- Pan L., Zhou, H., Li, J. et al. Draft genome sequence of *Sphingomonas paucimobilis* strain LCT-SP1 isolated from the Shenzhou X spacecraft of China. *Stand in Genomic Sci* 11, 18 (2016).
- Ramirez-Olea H., Reyes-Ballesteros B., Chavez-Santoscoy R.A. Potential application of the probiotic *Bacillus licheniformis* as an adjuvant in the treatment of diseases in humans and animals: A systematic review. *Front Microbiol.* 2022 Sep 26;13:993451. doi: 10.3389/fmicb.2022.993451.
- Rodrigo D., Rosell C.M., Martinez A. Risk of *Bacillus cereus* in Relation to Rice and Derivatives. *Foods.* 2021 Feb 2;10(2):302. doi: 10.3390/foods10020302.
- Tirloni E., Stella S., Celandroni F., Mazzantini D., Bernardi C., Ghelardi E. *Bacillus cereus* in Dairy Products and Production Plants. *Foods.* 2022 Aug 25;11(17):2572. doi: 10.3390/foods11172572.

© Колохина Анна Александровна (akolokhina@mail.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»