

Eric H. Houwink¹

Organon International
Holandia

Bezpieczeństwo biologiczne² w laboratorium i przemyśle biotechnologicznym

Procesy biotechnologiczne prowadzone z mikroorganizmami klasy 2, przy zachowaniu właściwej technologii pracy, mogą być prowadzone na takim samym poziomie bezpieczeństwa biologicznego jak praca w standardowym laboratorium pod warunkiem przestrzegania „Dobrej Techniki Mikrobiologicznej”³.

Bezpieczeństwo biologiczne polega na zapobieganiu przed skażeniem personelu i otoczenia podczas pracy z niebezpiecznymi mikroorganizmami. W większości laboratoriów klinicznych i przemysłowych używane są mikroorganizmy należące do klasy najmniejszego ryzyka (zaklasyfikowane jako EFB klasa 2). Mogą one wywoływać choroby u człowieka, a w konsekwencji stanowić zagrożenie dla personelu pracującego w laboratorium, jednakże jest mało prawdopodobne aby mogły się one samodzielną przeniesić do otoczenia (1).

Artykuł dotyczy zagadnienia bezpieczeństwa biologicznego w przemyśle przy operowaniu z mikroorganizmami klasy 2 EFB.

Dla zachowania bezpieczeństwa biologicznego w laboratorium, a także podczas przeprowadzania operacji technologicznych w zakładzie doświadczalnym lub w fabryce niezbędne jest przestrzeganie następujących trzech zasad:

- 1) przeszkolenia personelu w DTM,
- 2) motywacji personelu do przestrzegania bezpieczeństwa biologicznego,
- 3) zapewnienia bezpiecznych warunków pracy.

Podstawową zasadą mikrobiologiczną dla każdego mikrobiologa jest zasada utrzymywania własnych kultur w stanie czystym. Jednakże dla zapewnienia DTM należy przeprowadzić szereg pomiarów specjalistycznych związanych z bezpieczeństwem (2).

W Holandii przed przystąpieniem do prac z mikroorganizmami klasy 2 EFB lub w laboratorium, w którym wykonuje się prace z rekombinowanymi DNA, prowadzi się specjalne kursy szkoleniowe dotyczące DTM. Dostępne są też podręczniki instruktażowe łącznie z taśmami wideo, również w języku angielskim (3).

I. Do jakiego stopnia zapewnione jest bezpieczeństwo biologiczne w przemyśle

Problem zapewnienia bezpieczeństwa biologicznego w przemyśle biotechnologicznym pokrywa się z pytaniem, do jakiego stopnia można technicznie zabezpieczyć operacje biotechnologiczne w celu asekuracji personelu i środowiska. Niedawno opublikowano artykuł, w którym zawarte zostały wymagania dotyczące zapewnienia właściwych warunków pracy (2).

Jednakże w literaturze nie przedstawiono do tej pory żadnej oceny ryzyka związanego z dopuszczalnymi poziomami rozprzestrzeniania się mikroorganizmów klasy 2, które nie przed-

¹ Dr E. H. Houwink jest prezesem holenderskiej firmy biotechnologicznej ORGANON, profesorem Uniwersytetu w Leiden oraz przewodniczącym Holenderskiego Towarzystwa Biotechnologicznego.

² Biosafety.

³ Good Microbiological Technique (GMT), w języku polskim przyjęliśmy skrót DTM.

stawiają bezpośredniego zagrożenia dla człowieka. Zaleca się (4) jedynie w raporcie OECD aby przy pracach z mikroorganizmami i rekombinowanym DNA odpowiedniej klasy ryzyka – „zminimalizować rozprzestrzenianie”.

W laboratoriach mikrobiologicznych wydostawanie się niebezpiecznych mikroorganizmów do środowiska jest minimalizowane przez zastosowanie DTM. Przez wiele lat, prace z mikroorganizmami z klasy 2 EFB były przeprowadzane w laboratoriach klinicznych i szczepionkowych. Przeprowadzone doświadczenia wskazują, że DTM redukuje poziom rozprzestrzeniania się mikroorganizmów do takiego stopnia, że wypadki zainfekowania laboratorium zasadniczo w ogóle się nie zdarzają lub zachodzą bardzo rzadko.

Nasza hipoteza (przyjęta w firmie ORGANON) zakłada, że podczas operacji biotechnologicznych wydostawanie się do otoczenia mikroorganizmów klasy 2 EFB może być kontrolowane i minimalizowane do poziomu nie przekraczającego, a nawet niższego, niż poziom uzyskiwany podczas prac laboratoryjnych przy zastosowaniu DTM.

Grupa badawcza Holenderskiego Towarzystwa Biotechnologicznego zajmująca się problemem „Bezpieczeństwa Biologicznego w Przemśle” (5) podjęła inicjatywę oznaczenia poziomu skażenia powietrza i powierzchni podczas prac laboratoryjnych przy zastosowaniu DTM. Wyniki uzyskane z dziesięciu laboratoriów przemysłowych zastosowano jako wartość odniesienia dla oznaczenia skażenia środowiska przez mikroorganizmy otoczenia fermentorów przemysłowych oraz w trakcie procesów przepływowych. Testowano również skuteczność czterech dostępnych w handlu filtrów powietrza, stosowanych przy liniach wylotowych fermentorów.

Opracowanie wyników tych badań zostanie wkrótce opublikowane przez Holenderskie Towarzystwo Biotechnologiczne. Ponadto przedstawiony będzie także przegląd dziesięcioletnich doświadczeń związanych z bezpieczeństwem biologicznym w firmie ORGANON.

II. Oznaczanie skażenia powietrza i powierzchni

Skażenie powietrza badano stosując próbnik *Reuter Biotest Centrifugal Sampler* (RCS) (6a). Stwierdzono, że próbnik RCS jest przyrządem najpraktyczniejszym i zapewniającym największy odzysk badanej próbki (6b), używanym w codziennej praktyce dla oznaczania zanieczyszczenia powietrza w laboratorium i w zakładach biotechnologicznych.

Do pobierania próbek powierzchni zastosowano *Replicate Organism Direct Contact Plates* (RODAC). W celu identyfikacji mikroorganizmów klasy 2, reprezentatywne kolonie były posiewane na pożywkach selektywnych.

III. DTM w laboratoriach przemysłowych

Wyniki licznych testów dotyczących skażenia powierzchni i powietrza przeprowadzonych przez doświadczonych techników w czasie prac laboratoryjnych według zasad DTM zestawiono w tab. 1 (5).

Tabela 1

DTM w różnych laboratoriach przemysłowych

Operacja technologiczna	Wykryte skażenie	
	powierzchni	powietrza
posiew igłą	0	n.t.
pasażowanie pipetą	0	n.t.
mieszanie wirowe	n.t.	0
wydmuchiwanie pipet (nie uznawane za DTM)	0	14 poz./20

n.t. – nie testowano.

Podczas testowania sposobów przenoszenia kultur stwierdzono skażenie powietrza (w 14 spośród analizowanych 20 próbek) podczas wydmuchiwania zawieszin *Bacillus subtilis* w czasie pipetowania, a także ustalono, że sposób ten nie może być zaakceptowany jako DTM.

III. 1. Operacje biotechnologiczne

W szeregu zakładów przemysłowych podczas pracy badano różne fermentory o pojemności od 7 do 3000 litrów. Przez 30 min przy ciśnieniu 1–2 at badano przeciek i stwierdzono, że po sterylizacji i ochłodzeniu jest on mniejszy niż 3 mm ciśnienia wody.

Wielokrotnie były badane krytyczne powierzchnie (np. uszczelnienia mieszadeł) w celu wykazania ewentualnego skażenia spowodowanego przez wydostawanie się specyficznych mikroorganizmów z fermentatora. Odpowiednie próbki powietrza pobierano podczas przeprowadzania posiewu, pobierania próbek i po zakończeniu procesu. W ten sam sposób postępowano w czasie procesów przepływowych w zamkniętych wirówkach przemysłowych. Zestawienie wyników przedstawiono w tab. 2 (5).

Tabela 2

Bezpieczeństwo procesów biotechnologicznych

Operacja technologiczna lub stosowana aparatura	Wykryte skażenie	
	powierzchni	powietrza
posiew (system zamknięty)	0	0
fermentory (10,30,70,150,300,3000 l)	0	0
pobieranie próbek		
– system zamknięty	0	0
– system otwarty (nie DTM)	+	n.t.
wirowanie	n.t.	0
napelnianie, dekantowanie próbówek wirówkowych	+	n.t.
mieszanie wirowe (kabina bezpieczna biol. kl. 2)	(10–30 kolonii)	

n.t. – nie testowano, + – wykrycie skażenia

Stwierdzono, że podczas fermentacji i odwirowywania skażenie wystąpiło tylko w jednym przypadku, tj. w systemie otwartym. Stąd wniosek o konieczności pobierania próbek w systemie zamkniętym dla zapewnienia bezpieczeństwa biologicznego z organizmami klasy 2. Dane zawarte w tab. 2 wskazują na konieczność używania biologicznie bezpiecznych kabin dla normalnego napelniania i dekantowania probówek wirówkowych oraz mieszania wirowego zawieszin komórkowych. Podczas operacji manualnych nie można zapobiec tworzeniu się aerozoli, a w konsekwencji może nastąpić powierzchniowe skażenie kabin oraz rąk operatora. Celem zabezpieczenia tego rodzaju prac, niezbędne jest stosowanie standardowej praktyki odpowiedniej dezynfekcji.

III. 2. Bezpieczeństwo filtrów powietrza

Trzy holenderskie towarzystwa testowały pod względem bezpieczeństwa filtry powietrza stosowane przy fermentorach. W systemie testującym stosowano standardową metodę przyjmując: *Pseudomonas diminuta* (jako wzorcowy aerazol) oraz *Domnick Hunter* (jako wzorcowy filtr). W czasie testowania badano wpływ 4 różnych czynników na przenikanie każdego filtra:

- wilgotność względna (60, 80 i 95%),
- autoklawowanie filtrów powietrza (jedno- i 10-krotne),
- skład rozpylonego środowiska (pożywka, woda destylowana),
- poziom wzorcowego aerazolu (poniżej 10^6 , 10^6-10^7 , 10^7-10^8 mikroorganizmów).

Uważa się, że filtr jest przepuszczalny, jeżeli jedną lub więcej kolonii *Pseudomonas* wykryto na płytkach próbnika znajdującego się za testowanym filtrem.

IV. Wyniki

Wilgotność względna, skład rozpylonego środowiska i powtarzalność autoklawowania testowanych filtrów nie wpływała na wyniki testów przepuszczalności. Stwierdzono, że poziom wzorcowego aerazolu *Pseudomonas* jest jedynym i głównym czynnikiem powodującym przenikanie dla czterech badanych, dostępnych w handlu, filtrów powietrza. Przy poziomach wzorcowego aerazolu zawierającego poniżej 10^6 mikroorganizmów stwierdzono, że występuje jedynie sporadyczne przenikanie w 4 na 32 przeprowadzonych prób (jedna lub kilka kolonii na płytce). Jednakże już przy poziomie wzorcowym powyżej 10^6 komórek *Pseudomonas* stwierdzono przenikanie w około połowie przeprowadzonych testów dla wszystkich filtrów (10-30 kolonii na płytce). Nie możemy wytłumaczyć tego nieoczekiwanego wyniku, który dla producentów tych filtrów jest również zagadką. Wyniki te są także nie wyjaśnione z tego powodu, że testy kontrolne przeprowadzane z bakteriami kultur *Pseudomonas* przy zastosowaniu filtrów hydrofobowych wykazały, że nie występuje przenikanie przy poziomach wzorcowych 10^{13} mikroorganizmów na test. Zostało to potwierdzone badaniami wykonywanymi przez producentów filtrów.

Powstają pytania: jakie stężenie mikroorganizmów w aerazolu występuje normalnie, w gazach wylotowych fermentorów oraz jakie są poziomy stężenia w aerazolu, w filtrach powietrza, a także w normalnych warunkach pracy.

W oddzielnych doświadczeniach oznaczono stężenia aerazolu w gazach wylotowych w dwóch różnych fermentorach (o pojemności 10 l) przy różnych stopniach napowietrzania i prędkościach mieszadła. W czasie ośmiogodzinnej pracy przy prowadzeniu hodowli kultur, zawartość komórek bakteryjnych w aerazolu w filtrach powietrza wahała się między 10^4 a 10^5 .

Stwierdzono, że prowadząc fermentację w normalnych warunkach uchodzenie mikroorganizmów z gazami wylotowymi zabezpieczają handlowe filtry powietrza, przy współczynniku bezpieczeństwa w zakresie od 10 do 100. Ocenia się, że jest to operacja bezpieczna dla „minimalizowania” zanieczyszczenia powietrza podczas fermentacji przez aerazol z mikroorganizmami klasy 2. Natomiast w przypadku używania mikroorganizmów klasy 3 zaleca się stosowanie serii dwóch filtrów powietrza dla zabezpieczenia przed skażeniem.

V. Zasady bezpieczeństwa biologicznego w firmie Organon

Dziesięć lat temu w Organon rozpoczęto organizację pracy związanej z bezpieczeństwem biologicznym przy wszystkich pracach z mikroorganizmami klasy 2, w laboratoriach badawczych i rozwojowych, przy doświadczeniach ze zwierzętami oraz w instalacjach fermentacyjnych. Prace te dotyczą 25 różnych organizmów klasy 2, takich jak: *Staphylococcus aureus*, *Clostridia*, *Streptococci*, *Hepatitis A, B*, *Non A-Non B*, *Toxoplasma*, *Cytomegalovirus*, *Rubella*, wirus *Epstein-Barr*, wirus przemiany ciągłej linii komórek i surowicy pacjentów.

Za bezpieczeństwo biologiczne, instruktaż i kontrolę są odpowiedzialni kierownicy bezpieczeństwa biologicznego, asystenci bezpieczeństwa biologicznego w każdym laboratorium oraz kierownik lecznictwa zawodowego. Nowo przyjmowany personel poddawano ogólnym badaniom medycznym, natomiast surowice krwi poszczególnych pracowników przechowywane są jako materiał referencyjny. Raz lub dwa razy w roku, cały personel zostaje poddawany kontroli lekarskiej i jeżeli jest to konieczne przeprowadza się również badania serologiczne. Uzyskane wyniki oceniane są jako próba dotycząca ogólnego bezpieczeństwa biologicznego.

VI. Wypadki bioniebezpieczne i nadzór medyczny

Wypadki związane z bezpieczeństwem biologicznym, są starannie notowane, dyskutowane z personelem, a jeżeli zachodzi konieczność, przeprowadza się dokładne pomiary. Zespół lecznictwa zawodowego decyduje o leczeniu i w przypadku wskazań, jak już wspomniano, przeprowadza kontrolę serologiczną.

Analiza wykazała, że 60% wypadków było spowodowane stłuczeniem lub rozsypaniem zakażonych materiałów, a 40% zranieniem lub rozbryzgiem szkodliwych substancji do oczu. Pozostałe wypadki występowały głównie w odizolowanych pomieszczeniach dla zwierząt, a w szczególności przy obsłudze szympanów. Raporty medyczne dotyczące 40 zranień nie wykazały konsekwencji serologicznych lub ujawnienia się choroby. W czasie systematycznych kontroli medycznych, przypadkowych konwersji serologicznych nie można było przypisać, ...cy w obszarze bioniebezpiecznym (z wyjątkiem jednego przypadku). Spośród personelu prowadzącego badania nad *Hepatitis B*, zaobserwowano jeden przypadek konwersji serologicznej, na szczęście bez objawów chorobowych. Przypadek ten nie był związany z wypadkiem lub zakłóceniem procesów bioniebezpiecznych. Ponieważ był to jedyny poważniejszy przypadek w czasie całej dekady działania firmy Organon związanej z bezpieczeństwem biologicznym, możemy zaufać wszystkim staraniom dotyczącym bezpieczeństwa biologicznego.

VII. Wnioski

W podsumowaniu można stwierdzić, że procesy biologiczne z mikroorganizmami klasy 2 mogą być prowadzone na takim samym poziomie bezpieczeństwa, jak rutynowe prace laboratoryjne, pod warunkiem stosowania zasad DTM oraz zastosowania właściwej technologii i wyposażenia laboratorium. Wniosek ten dotyczy również organizmów ze zrekombinowanym DNA (o odpowiedniej klasie ryzyka).

tłumaczył i opracował W. Trzebny

Literatura

1. Küenzi M., et al., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 1.
2. Vranich S. P., (1987), 4th European Congress on Biotechnology, 4, 355.
3. Safe Microbiological Technique, Concepts needed for Understanding and Practicing, Instruction course and Videotape (VHS) by the Netherlands rec DNA Committee.
4. OECD Report Recombinant DNA Safety Considerations, (1987), ISBN 92-64-12857-3.
5. Tuijnenburg Muijs G., et al., *Swiss Biotech*, (1987), 5, 2^A, 44 and Tuijnenburg Muijs G., (1987), *Proc. 4th European Congress on Biotechnology*, 4, 371.
- 6a. Clark S., et al., (1981), *J. Hosp. Infection*, 2, 181.
- 6b. Stewart I. W., et al., (1988), *Proceedings Second Netherlands Biotechnology Congress*, Elsevier.

Biosafety in laboratory and biotechnology industry

Summary

The paper deals with biosafety aspects of handling EFB Class 2 microorganisms in industry. It presents the summary of the results of the collaborative studies taken to determine air and surface contamination levels during GMT laboratory work, the results of studies of contamination by microorganisms around industrial fermenters and during downstream processing and also the safety of four commercial air filters used on exhaust lines of fermenters. Furthermore, ten years of experience with biosafety at Organon was reviewed. In conclusion one can state that biotechnological processes with Class 2 microorganisms can be performed at the same level of safety as work in the laboratory, if Good Microbiological Technique is strictly adhered to and suitable physical containment is applied. This holds also for recombinant DNA organisms of the corresponding risk class.

Adres dla korespondencji:

Włodzimierz Trzebny, Ośrodek Informacji Naukowej PAN, ul. Stary Rynek 77, Poznań.

NOWOŚCI!

W poszukiwaniu ziemniaków produkujących plastik

Jednym z nowych zadań inżynierii genetycznej jest stworzenie warunków do produkcji plastiku w komórkach bakterii, czy nawet roślin uprawnych. Badania nad produkcją naturalnego plastiku obejmują rosnącą liczbę laboratoriów w USA, Japonii, Anglii, Austrii i Niemczech Zachodnich. Dofinansowania na ten cel sięgają milionów dolarów. Korzyści płynące z użycia naturalnego plastiku wynikają z możliwości jego biodegradacji i z faktu zmniejszenia zapotrzebowania na ropę naftową.

Początkiem badań było znalezienie formy poliesteru w ciele bakterii *Alcaligenes eutrophus* przez brytyjskich uczonych parę lat temu. Zainteresowanie gwałtownie wzrosło w ciągu ostatniego roku na wiadomość o sklonowaniu genu odpowiedzialnego za produkcję plastiko-podobnego polimeru. W efekcie możliwa jest dziś hodowla komórek *A. eutrophus* zawierających ponad 80% polimerów w suchej masie. Problematiczna pozostaje jednak ekstrakcja polimeru. Występuje on w postaci ziaren zbudowanych z tysięcy pojedynczych łańcuchów wewnątrz komórki bakteryjnej. Trudność polega na zniszczeniu błon komórkowych bez uszkodzenia granul. Dodatkowo, temperatura topnienia polimeru jest bardzo zbliżona do temperatury jego rozkładu.

Obecne badania prowadzą więc w kierunku genetycznej modyfikacji *A. eutrophus*, aby zmienić właściwości chemiczne polimeru. Podobny cel można osiągnąć poprzez przeniesienie wyżej wspomnianego genu do innej, lepiej poznanej bakterii, np. *Escherichia coli*.

Marzeniem naukowca z Michigan State University, dra Chris Somerville, jest zastąpienie produkcji skrobi syntezą polimeru u roślin uprawnych. Sama inkorporacja genu nie jest tak kłopotliwa jak zmodyfikowanie dróg enzymatycznych dla zablokowania istniejących enzymów i uaktywnienia nowych cykli. Jako rośliny modelowe wybrano kukurydzę i ziemniak. Spełnieniem życzeń będzie stworzenie ziemniaka produkującego „plastikowe bulwy”. To śmiałe przedsięwzięcie znalazło już finansowe poparcie ze strony Pioneer Hybrid, jednej z największych kompanii rolniczych w USA.

Joanna Werner

Opracowano na podstawie: (September, 1989), Science, 245, 1187-1189.