

**УДК 616: 579.61****ОЦЕНКА АЛЛЕРГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ***С.С. Ануарбекова, А.Б. Аканов, А.С. Мацжанова*

ДГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», г. Астана

При внедрении культур микроорганизмов или их метаболитов в производство необходимо оценить их токсичность, токсигенность, аллергенность. В связи с этим нами проведена оценка фактора аллергенности. Было изучено 5 коллекционных штаммов молочнокислых бактерий, рекомендованных в качестве заквасочных культур. Также исследовано 7 изолятов бацилл, перспективных для очистки сточных вод от жировых отложений. Для этого использованы конъюнктивальная проба и реакция непрямой дегрануляции тучных клеток. В ходе работы установлено, что данные объекты фактором аллергенности не обладают.

Практическое применение современных биологических знаний, интенсивное развитие биотехнологии открывает возможность решения важнейших проблем здравоохранения, ветеринарии, фармакологии, пищевой промышленности, аграрного сектора, охраны окружающей среды. Благодаря научным достижениям микробиологии, внедрению новых разработок генной инженерии, стало возможным получение высокотехнологичных штаммов микроорганизмов с повышенной продуктивностью [1-7].

Одним из этапов при внедрении в производство культур микроорганизмов или их производных, является оценка их биобезопасности. Необходимо изучить их патогенность, вирулентность, аллергенность [8-10], наличие тех или иных факторов патогенности, которыми могут быть ферменты, выполняющие двоякую роль: факторов защиты или адаптации к тем или иным условиям окружающей среды и факторов инвазивности, приводящие к развитию заболеваний.

Под алергизирующими свойствами [11] понимают способность того или иного вещества вызывать при введении в организм состояния повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсбилизация), в основе которой лежат различные иммунопатологические механизмы.

Таким образом, при использовании культур микроорганизмов необходимо проведение исследований для оценки

аллергенности с целью обеспечения биобезопасности человека и окружающей среды.

Целью работы было изучение аллергических свойств некоторых перспективных культур микроорганизмов.

Материалы и методы

Оценка аллергенного фактора проводилась на 12 культурах микроорганизмов (5 коллекционных культур молочнокислых бактерий и 7 изолятов бацилл). Для этого в работе нами использованы конъюнктивальная проба и реакция непрямой дегрануляции тучных клеток [11-15].

Изучение аллергенности культур конъюнктивальной пробой [11-15].

Культуры выращивались в стандартных условиях, далее культуры разводились в соотношении 1:10 с раствором Хэнкса и инкубировались в термостате при температуре 37°C в течение 48 часов. В ходе инкубации раствор дважды встряхивался.

Для постановки пробы 1 каплю водного раствора аллергена вводят глазной пипеткой с вытянутым тонким концом под верхнее веко подопытным и контрольным животным, во второй глаз (контрольный) вводят 1 каплю воды. Закапывание удобно производить при положении животного лежа головой вниз.

Реакции учитывают через 15 мин (быстрая реакция - БР) и через 24-48 часов (гиперчувствительность замедленного типа - ГЗТ) и оценивают по следующей шкале (в баллах):



1 - легкое покраснение слезного протока;
2 - покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;

3 - покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Реакция сопровождается зудом и при расчесывании лапками возможно развитие гнойного офтальмита. Подбор концентрации аллергена осуществляется путем закапывания различных концентраций в глаз несенсибилизированного животного. Опыт проводился на кроликах.

Изучение аллергенности культур с помощью реакции непрямо́й дегрануляции тучных клеток [11-15].

Для этого брали суточную культуру, проводили центрифугирование 3 000 об/мин, в дальнейшем в работе использовали полученный центрифугат.

Полученные пробы экстрагировались в растворе Тироде при температуре 37°C в течение 24 часов, в течение экстракции пробирки встряхивались дважды (разведение 1:10).

В экспериментах используются крысы популяции Вистар, массой 200-225 г. Животных забивают методом быстрого кровопускания. Затем внутрибрюшинно вводят 7-8 мл подогретого до 37°C раствора Тироде без глюкозы. Производят в течение 1-1,5 минут лёгкий массаж брюшной стенки, делают разрез ножницами по средней линии живота длиной 1,5-2,0 см, переворачивают тушку разрезом вниз и собирают экссудат, стекающий с петель кишечника в смоченную гепарином пробирку (центрифугирование 3 000 об/мин - 3-5 мин с добавлением гепарина). Препараты готовят на обезжиренных стёклах камеры Горяева, окрашенных 0,3% спиртовым раствором нейтрального красного и высушенных при комнатной температуре. К 0,03 мл взвеси тучных клеток добавляют 0,03 мл сыворотки опытного животного и 0,03 мл испытуемого экстракта, предварительно разведенного в 10 раз. Препараты покрывают покровным стеклом, края которого смазывают вазелином, затем инкубируют 15 мин в термостате при температуре 37°C. Пре-

параты микроскопируют под увеличением $\times 20$. Оценку результатов проводят дифференциальным способом учета, подсчитывают показатель дегрануляции тучных клеток по формуле:

$$\text{ПДТК} = (1a + 2b + 3c + 3d) / 100,$$

где **a**, **b**, **c**, **d** - среднее из трёх повторений количество дегранулированных клеток с различной степенью дегрануляции (слабая, выраженная, резкая и полностью дегранулированные клетки).

Показатели **a**, **b**, **c**, **d** насчитываются из ста клеток. Реакция считается положительной, если ПДКТ превышает 2,0.

Результаты и обсуждение

Нами в работе изучены алергизирующие свойства по отношению к молочнокислым бактериям, бациллам, а также их консорциумам.

Молочнокислые бактерии представлены 3 консорциумами БП-1, БП-2, БП-3, рекомендованными для приготовления кисломолочных продуктов, консорциумом бифидумбактерий «мульти», перспективного для получения пробиотического препарата и продуцентом бактериоцина - штаммом *L. casei*. Заквасочные консорциумы составляют штаммы *L. lactis*, *S. thermophilus*, *B. bifidum*, *S. delbrueckii*, *L. delbrueckii* в различных сочетаниях. Консорциум бифидумбактерий «мульти» создан на основе 4 штаммов бифидобактерий.

Микроорганизмы, перспективные для очистки сточных вод от жировых отложений, представлены бактериями рода *Bacillus*. Это 3 изолята *B. licheniformis*, 1 изолят *B. subtilis*, коллекционный штамм *B. subtilis* 720 и 2 консорциума. Консорциум 1б состоит из *B. subtilis* 8 и *B. licheniformis* 3, а консорциум 2б - *B. subtilis* 720 и *B. licheniformis* 3.

Изучение аллергенности культур проводили методом непрямо́й дегрануляции тучных клеток.

На рисунках 1, 2 показано отсутствие признаков аллергенности, изучаемых методом непрямо́й дегрануляции тучных



клеток, т.е. клеток, обладающих признаками дегрануляции, нет.

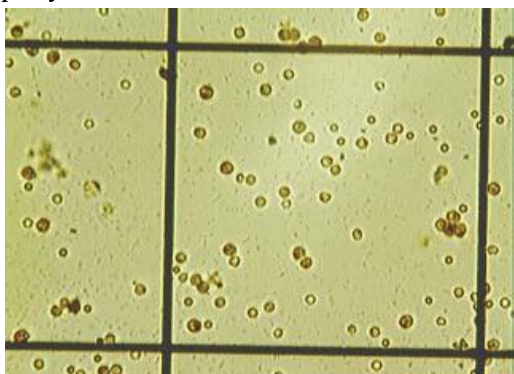


Рис. 1. Изучение аллергенности консорциума БП-2 методом не прямой дегрануляции тучных клеток x 20

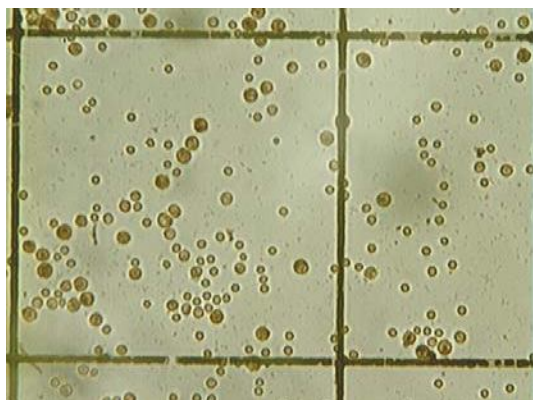


Рис. 2. Изучение аллергенности *B. licheniformis* 3 методом не прямой дегрануляции тучных клеток x 20

Числовые результаты дегрануляции отражены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты изучения аллергенности культур микроорганизмов, полученные методом не прямой дегрануляции тучных клеток

№	Название культур микроорганизмов	ПДТК общий
1	<i>B. licheniformis</i> 1	1,26
2	<i>B. licheniformis</i> 3	1,12
3	<i>B. licheniformis</i> 10	1,18
4	<i>B. subtilis</i> 8	1,19
5	<i>L. casei</i> BI 005	1,26
6	<i>B. subtilis</i> 720	1,11
7	Консорциум БП-1	1,08
8	Консорциум БП-2	1,09
9	Консорциум БП-3	1,13
10	Консорциум бифидобактерин	1,11
11	Консорциум бацилл 1	1,27
12	Консорциум бацилл 2	1,16

Показатель дегрануляции тучных клеток во всех 12 пробах не превышает 2,0, что свидетельствует о том, что изученные нами объекты фактором аллергенности не обладают.

Для изучения аллергенности культур мы применили конъюнктивальную пробу, результаты которой отражены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты изучения аллергенности культур, полученные с помощью конъюнктивальной пробы

№	Название культур микроорганизмов	Результат в баллах	
		Быстрая реакция	ГЗТ
1	<i>B. licheniformis</i> 1	1	0
2	<i>B. licheniformis</i> 3	1	0
3	<i>B. licheniformis</i> 10	1	0
4	<i>B. subtilis</i> 8	0	1
5	<i>L. casei</i> BI 005	1	1
6	<i>B. subtilis</i> 720	0	2
7	Консорциум БП-1	0	1
8	Консорциум БП-2	0	1
9	Консорциум БП-3	1	0
10	Консорциум бифидобактерин мульти	1	0
11	Консорциум бацилл 1	1	0
12	Консорциум бацилл 2	1	2

Итак, 10-кратное превышение КОЕ вышеперечисленных культур практически не влияет на развитие аллергии в здоровом организме. Но, необходимо отметить то, что *B. subtilis* и консорциумы, содержащие данный штамм, могут спровоцировать аллергическую реакцию. Также, в разработке технологии заквасок необходимо точно подбирать количество *L. casei*, т.к. она также может спровоцировать аллергическую реакцию.

Наряду с этим нами были изучены гемолитическая и лецитиназная активность *in vitro*, которые отражают фактор патогенности. Результат отрицательный, что также свидетельствует о возможности применения исследуемых культур микроорганизмов в различных сферах биотехнологической промышленности.

Таким образом, в ходе исследования нами проведена оценка фактора аллер-



генности 12 перспективных культур микроорганизмов. Установлено, что данные биообъекты фактором аллергенности не обладают, и нужно учитывать в дальнейшей работе полученные результаты, так как при внедрении в разработки изученных бактерий необходимо подбирать точную дозировку.

Литература

1. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – 3-е изд. – М.: Академия, 2006. – 208 с.
2. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология. – М.: Академия, 2006. – 254 с.
3. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии - продуценты биологически активных веществ. - Киев: Наукова думка, 1982. - 280 с.
4. Шлегель Г.Г. Общая микробиология: Пер. с нем. - М.: Мир, 1987. - 567 с.
5. Бери Д. Биология дрожжей. – М.: Мир, 1985. - 95 с.
6. Дудикова Г.Н. Биотехнологические основы использования лактобацилл для защиты зерно-продуктов от бактериальной контаминации: Дисс. ... докт. биол. наук. - Алматы, 2002. - 320 с.
7. Каталог культур микроорганизмов. – Астана, 2003. - 186 с.
8. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Московский Университет, 1995. – 220 с.
9. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. - М.: Медицина, 1978. – 392 с.
10. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред М.О. Биргер. – М.: Медицина, 1982. – 462 с.
11. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых ферментных веществ. – М., 2005. - 398 с.
12. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. - М.: Мир, 1984. - В 3-х т. - Т. 3, 1984. – 261 с.
13. Методические рекомендации к постановке исследований по оценке вирулентности штаммов-продуцентов микроорганизмов, предназначенных для получения продуктов микробиологического синтеза. – М., 1982.
14. Методические указания «Постановка исследований для обоснования ПДК производственных штаммов и на основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны». – М., 1983.
15. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах окружающей среды. – М., 1993.

Түйін

Микроағзалар культураларын немесе олардың метаболиттерін өндіріске енгізу кезінде міндетті түрде олардың улылығын, токсигендігін, аллергендігін бағалау қажет. Осыған байланысты аллергендік факторын бағалау жүргізілді. Ашытқы культурасы ретінде ұсынылған сүт қышқылы бактерияларының коллекциялық 5 штамдарымен зерттеу жүргізілді. Сондай-ақ, ағын суларын май қалдықтарынан тазартуда перспективалы бациллалардың 7 изоляты зерттелген. Бұл үшін конъюнктивалды үлгі және толық жасушалардың түзу емес түйіршіксіздену реакциясы қолданылған. Жұмыс барысында осы нысандардың аллергендік факторларының жоқ болғандығы анықталды.

Summary

It is necessary to assess toxicity, toxigenicity and allergenicity of microorganisms or their metabolites before manufacturing application. As a result evaluation of the allergenicity factor has been undertaken. 5 collection strains of *Lactobacillus* bacteria have been recommended as starters. Moreover, 7 isolates of the *Bacillus* were found to be good candidates for wastewater treatment from fat depots. The reaction of indirect degranulation of obese cells was used as a conjunctival test. It has been established that test subjects do not possess allergenicity factor.