

Экспериментальная оценка иммунотоксического действия штамма *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93 – деструктора токсичных фосфорорганических соединений

© 2012. К. К. Стяжкин¹, д.б.н., начальник, И. В. Дармов², д.м.н., начальник,
В. Н. Бредихин³, д.т.н., зав. отделом, К. А. Воробьев², к.б.н., зам. начальника,
И. П. Погорельский², д.б.н., в.н.с., А. А. Лещенко², д.т.н., в.н.с.,
А. Г. Лазыкин², к.б.н., с.н.с.,

¹ Управление биологической защиты Управления начальника войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных сил Российской Федерации,

² 48 Центральный научно-исследовательский институт
Министерства обороны Российской Федерации»,

³ «Противочумный центр» Роспотребнадзора,
e-mail: biologiavgy@yandex.ru

Представлены результаты изучения иммунотоксического действия штамма *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93 – деструктора токсичных фосфорорганических соединений, имеющие существенное значение для оценки его безвредности и экологической безопасности.

This article reveals the results of study of immunotoxic properties of organo-phosphorus substances' biodestructuring strain *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93, they are essential for assessment of its harmful effect and environmental safety.

Ключевые слова: штамм-биодеструктор, токсичные фосфорорганические соединения, биотехнология, утилизация отходов

Keywords: biodestructuring strain, toxic organo-phosphorus compounds, biotechnology, waste disposal

Перспектива использования биотехнологии для переработки отходов, образующихся при уничтожении фосфорорганических соединений (ФОС), является наиболее предпочтительной, в том числе при выводе из эксплуатации объектов по уничтожению химического оружия [1]. Строительство таких объектов, предусмотренное принятой в марте 1996 года Федеральной целевой программой «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации», явилось важным этапом выполнения международных обязательств в рамках реализации «Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении», вступившей в силу 29 апреля 1997 года [2].

В отношении микроорганизмов, предназначенных для использования в биотехнологии переработки отходов, образующихся при утилизации ФОС, разработаны требования, которым они должны соответствовать [1, 3]. Важнейшим из этих требований является безвредность для людей и экологическая безопасность для окружающей среды. Полная ха-

рактеристика данных микроорганизмов имеет весьма важное значение для создания на их основе соответствующих биопрепаратов, а также получения разрешительных документов на их производство, применение (использование) и реализацию.

Разрабатываемая биотехнология утилизации продуктов гидролиза токсичных ФОС, предусматривает использование бактерий штамма-деструктора *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93, сохраняющих свои основные биологические свойства на всех этапах процесса и являющихся безопасными для человека и окружающей среды. Выполненный предыдущий цикл исследований, связанный с изучением в опытах *in vivo* вирулентности, токсигенности, токсичности, хронического общетоксического действия на организм экспериментальных животных, а также раздражающего действия на слизистую оболочку глаз бактерий штамма-деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 свидетельствовал об отсутствии у микробных клеток признаков патогенности [4]. Данное обстоятельство открывает перспективу дальнейшего углубленного изучения биологи-

ческих свойств бактерий штамма-деструктора. Исходя из вышеизложенного, целью работы было экспериментальное изучение иммунотоксического действия штамма-деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 в опытах на лабораторных животных, что имеет существенное значение для оценки безопасности штамма для людей.

Материалы и методы

В работе был использован штамм-деструктор ФОС *P. fluorescens* ЕК-5-93, хранящийся в коллекции технофильных микроорганизмов ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России». Штамм выделен из мест естественной адаптации к ФОС [4, 5], имеет высокую деструктивную активность, способность к накоплению биомассы в процессе культивирования и другие свойства, необходимые для использования при переработке отходов, образующихся в процессе утилизации ФОС.

Культуру бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93 выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при температуре 28 °С в течение 48 часов. Для проведения экспериментов выросшую культуру бактерий смывали с поверхности плотной питательной среды физиологическим раствором хлорида натрия.

Концентрацию живых микробов в суспензиях оценивали методом посева серийных десятикратных разведений на плотную питательную среду (агар Хоттингера) в чашках Петри с последующим подсчётом выросших колоний. Общую концентрацию бактерий в культурах и суспензиях определяли по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42-28-29-86П).

Изучение иммунотоксического действия бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 проводили в опытах *in vitro* и *in vivo* с использованием лабораторных животных [6]. Нелинейных белых мышей массой 18–20 г и морских свинок массой 180–200 г получали из питомника ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России».

Для изучения антигенных свойств бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 животным опытной группы в течение 30 дней вводили ежедневно интраназально и перорально суспензию бактерий в физиологическом растворе хлорида натрия. С учётом объёма вдыхаемого воздуха расчётная доза бактериальных клеток исследуемого штамма для интраназального способа введения белым мышам и морским свинкам составила 10^4 и 10^5 микробов соответственно. При пероральном способе введе-

ния животные (соответственно белые мыши и морские свинки) получали 10^4 и 10^5 микробов в объёме 0,2 см³ и 1,0 см³. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор хлорида натрия. Уровень антител определяли в реакции гемагглютинации в ряде последовательных разведений декомплементированной сыворотки в микротитраторе «Такачи». Титр гемагглютининов выражали величиной $\log_2 T$, где T – титр исследуемой сыворотки.

Постановку реакции гемагглютинации и изучение фагоцитарной активности нейтрофилов крови в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) выполняли согласно рекомендациям [7].

Оценку фагоцитарной активности нейтрофилов крови проводили у белых мышей и морских свинок с использованием цитохимического метода [7], основанного на способности гранулоцитов к поглощению красителя нитросинего тетразолия и восстановлению его до формазана. Метод отражает итоговую реакцию, ответственную за цитотоксический потенциал фагоцитирующих клеток. В приготовленных мазках крови экспериментальных животных определяли количество формазан положительных клеток.

Исследование иммуномодулирующего действия бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 при хроническом интраназальном и пероральном поступлении в организм экспериментальных животных оценивали в тесте спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК) [8]. Лимфоциты выделяли по общепринятой методике в градиенте плотности фиколл-верографина. Смесь суспензии лимфоцитов и взвеси эритроцитов барана инкубировали при температуре 37 °С в течение 10 мин, затем центрифугировали 5 мин при 1500 об. · мин⁻¹ и выдерживали в течение 1 ч при температуре 4 °С в холодильнике, после чего надосадочную жидкость удаляли, а оставшуюся взвесь осторожно суспендировали и наносили на предметное стекло. Окрашенные по методу Романовского-Гимза мазки микроскопировали под масляной иммерсией и просчитывали 100 лимфоцитов, вычисляя процент Т-розеток (лимфоцит с тремя и более эритроцитами барана).

Изучение диссеминации бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 проводили методом посева отпечатков внутренних органов животных, вышедших из опытов, на 1 и 15 сутки после завершения хронического эксперимента [6]. Мазки-отпечатки делали с трёх срезов каждого органа: сердца, лёгких, печени и се-

лезёнки, соблюдая правила асептики, на чашки Петри с агаром Хоттингера и синтетической минимальной средой с органофосфонатом (глифосатом). Полученные посевы инкубировали при температуре 28 ± 1 °С в течение двух суток. По окончании срока культивирования просматривали чашки, отмечали характерные для *P. fluorescens* ЕК-5-93 колонии и подсчитывали их количество.

Результаты

Для постановки реакции гемагглютинации опытную и контрольную группы экспериментальных животных иммунизировали эритроцитами барана, вводя внутривенно 10^9 эритроцитов в объёме 0,5 см³. Результаты определений представлены в таблице 1.

Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что изучаемый штамм при хроническом воздействии в концентрациях до 10^5 микробных клеток не приводит к достоверному усилению синтеза гемагглютининов в сыворотке крови подопытных животных. Титр \log_2 Т гемагглютининов для белых мышей и морских свинок, используемых в экспериментах, составлял 4,47 и 6,33 ед. соответственно.

Результаты исследований по определению фагоцитарной активности нейтрофилов крови белых мышей и морских свинок представлены в таблице 2. Как следует из представленных в таблице данных, интраназальное и пероральное введение бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 не вызывает достоверного изменения показателя фагоцитарной активности нейтрофилов крови у подопытных животных.

Таблица 1

Результаты определения титров гемагглютининов в сыворотке крови экспериментальных животных при хроническом введении бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93

Вид животных	Группа животных	Способ введения	Количество введённых бактерий, КОЕ	Титр \log_2 Т гемагглютининов
Белые мыши	Контрольная (введение физиологического раствора)	Интраназальный	–	4,47
		Пероральный	–	4,47
	Опытная (введение <i>P. fluorescens</i> ЕК-5-93)	Интраназальный	10^4	4,47
			10^5	4,47
		Пероральный	10^4	4,47
			10^5	4,47
Морские свинки	Контрольная (введение физиологического раствора)	Интраназальный	–	6,33
		Пероральный	–	6,33
	Опытная (введение <i>P. fluorescens</i> ЕК-5-93)	Интраназальный	10^4	
			10^5	6,33
		Пероральный	10^4	6,33
			10^5	6,33

Таблица 2

Фагоцитарная активность нейтрофилов крови при хроническом введении штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 экспериментальным животным

Вид животных	Группа животных	Способ введения	Количество введённых бактерий, КОЕ	Количество формазан положительных клеток ($\bar{X} \pm I_{95}$), %
Белые мыши	Контрольная (введение физиологического раствора)	Интраназальный	–	20,8±0,5
		Пероральный	–	20,2±0,6
	Опытная (введение <i>P. fluorescens</i> ЕК-5-93)	Интраназальный	10^4	18,6±0,2
			10^5	22,2±0,5
		Пероральный	10^4	19,9±0,6
			10^5	23,6±0,2
Морские свинки	Контрольная (введение физиологического раствора)	Интраназальный	–	22,7±0,5
		Пероральный	–	23,0±0,6
	Опытная (введение <i>P. fluorescens</i> ЕК-5-93)	Интраназальный	10^4	24,7±0,2
			10^5	25,2±0,5
		Пероральный	10^4	22,6±0,6
			10^5	23,0±0,2

Таблица 3

Результаты определения количества Т-лимфоцитов в тесте спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана

Вид животных	Группа животных	Способ введения	Количество введённых бактерий, КОЕ	Количество Т-розеток ($\bar{X} \pm I_{95}$), %
Белые мыши	Контрольная (введение физиологического раствора)	Интраназальный	–	22,8±0,5
		Пероральный	–	27,2±0,6
	Опытная (введение <i>P. fluorescens</i> ЕК-5-93)	Интраназальный	10 ⁴	20,1±0,2
			10 ⁵	18,7±0,5
		Пероральный	10 ⁴	22,0±0,6
			10 ⁵	20,8±0,2
Морские свинки	Контрольная (введение физиологического раствора)	Интраназальный	–	25,7±0,5
		Пероральный	–	27,0±0,6
	Опытная (введение <i>P. fluorescens</i> ЕК-5-93)	Интраназальный	10 ⁴	14,7±0,2
			10 ⁵	11,5±0,5
		Пероральный	10 ⁴	25,5±0,6
			10 ⁵	27,1±0,2

Результаты оценки иммуномодулирующего действия бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 при хроническом интраназальном и пероральном введении белым мышам и морским свинкам представлены в таблице 3. Приведённые в таблице данные свидетельствуют о том, что интраназальное и пероральное введение бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 в дозах 10⁴ и 10⁵ бактерий не вызывало достоверного усиления розеткообразования у подопытных животных в сравнении с контрольной группой.

Заключительным этапом исследований, связанных с изучением хронического воздействия на организм экспериментальных животных бактерий штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93, было определение степени диссеминации бактерий в организме белых мышей при интраназальном и пероральном способах введения. Просмотр чашек Петри после инкубирования посевов мазков-отпечатков на агар Хоттингера не выявил роста специфических для изучаемого штамма бактерий колоний. Полученные результаты свидетельствуют, что бактерии штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 при указанных способах введения в организм в дозах 10⁴ и 10⁵ микробных клеток в ходе хронического эксперимента не диссеминируют из мест первичной аппликации и не колонизируют внутренние органы экспериментальных животных.

Обсуждение

Псевдомонады относятся к тем микроорганизмам, разнообразие свойств которых позволяет им занимать различные экологические ниши. Многие из них являются условно-патогенными, представляя реальную

угрозу жизни для ослабленных больных. Микроорганизмы вида *Pseudomonas fluorescens* не являются исключением. Ряд штаммов является фитопатогенным, вызывая бактериозы семян хвойных [9]. Другие штаммы, являясь продуцентом витамина В₁₂ или используемые в составе препарата для очистки почвы от нефтяных загрязнений, способны вызывать аллергические заболевания у людей [10], что требует определения допустимой концентрации штаммов *P. fluorescens* в воздухе рабочей зоны.

Исследуемый штамм микроорганизма-деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93, хотя и является природным изолятом, планируется для широкого использования в биотехнологии переработки продуктов гидролиза токсичных ФОС. Это обстоятельство с неизбежностью диктует необходимость всестороннего и глубокого изучения свойств микроорганизма-деструктора с целью оценки его биологической и экологической безопасности. В ходе выполнения первого цикла исследований, связанных с изучением вирулентности, токсигенности, токсичности, хронического общетоксического действия штамма ЕК-5-93 в опытах на экспериментальных животных, было доказано отсутствие признаков патогенности у микробных клеток.

С учётом полученных данных проведено изучение иммунотоксического действия штамма *P. fluorescens* ЕК-5-93 в опытах *in vivo*, результаты которого представлены в настоящей работе. Иммунотоксическое действие бактерий может проявляться сенсibilизацией, иммунизацией и неспецифической иммуномодуляцией. Поскольку бактерии являются облигат-

ными аллергенами [10] и различаются лишь степенью выраженности данного эффекта, то при проведении настоящих исследований оценивали порог сенсибилизации для изучаемого штамма. В результате было установлено, что штамм *P. fluorescens* ЕК-5-93 не обладает иммунотоксическим действием.

Важной характеристикой бактерий служит их способность к диссеминации *in vivo* при определённом способе поступления в организм экспериментальных животных. Определение порога диссеминации бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93 в организме животных осуществляли путём посева мазков-отпечатков крови и внутренних органов на селективную питательную среду. Параллельно с бактериологическим исследованием проводили оценку патоморфологических изменений лёгких, сердца, селезёнки, печени и почек. В ходе эксперимента патоморфологических изменений внутренних органов экспериментальных животных не наблюдали. При высевах крови и мазков-отпечатков внутренних органов на селективную питательную среду культуру бактерий *P. fluorescens* ЕК-5-93 не выделяли. Эти результаты свидетельствуют о том, что исследуемый штамм псевдомонад не обладает диссеминирующей способностью.

Заключение

В результате выполненных исследований по оценке иммунотоксического действия на организм лабораторных животных бактерий штамма-деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 экспериментально доказано отсутствие специфического влияния микробных клеток на иммунную систему и способности к диссеминации при интраназальном и пероральном способах их введения. Указанные характеристики биологических свойств бактерий штамма – деструктора *P. fluorescens* ЕК-5-93 создают необходимую предпосылку его практического использования в качестве основы для конструирования безопасного для организма человека биопрепарата, перспективного для использования в биотехнологии утилизации реакционных масс, содержащих остаточные количества ФОС.

Работа была выполнена при поддержке Государственного контракта № ЦР/07/2085/УЗО/К.

Литература

1. Чупис В.Н., Растегаев О.Ю., Малишевский А.О. Перспективные подходы к перепрофилированию объектов по уничтожению химического оружия. Реагентные технологии извлечения мышьяка из мышьяксодержащих реакционных масс и отходов // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 1. С. 87–95.
2. Капашин В.П. Успешный ввод и эксплуатация трёх новых объектов по уничтожению химического оружия – подтверждение Россией обязательств Конвенции // Теоретическая и прикладная экология. 2007. № 2. С. 8–11.
3. Воробьёва Л.И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во «Знание», 1985. 64 с.
4. Погорельский И.П., Дармова Е.М., Жаворонкова Л.В., Соколова И.В., Филиппов А.В., Шведов В.В. Оценка безопасности штамма-биодеструктора токсичных фосфорорганических соединений *Pseudomonas fluorescens* ЕК-5-93 // Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология: Матер. Всерос. научн. конф., посвящ. 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России». Киров. 2008. С. 409–411.
5. Пат. 2154103 Российская Федерация. Штамм *Pseudomonas species* 78Г, предназначенный для деградации фосфорорганических отравляющих веществ / А.Т. Харечко, В.И. Мягких, И.О. Колесников, Д.П. Колесников, В.Д. Королев, А.А. Лысов, Ю.А. Матущенко, Н.В. Завьялова, Ю.А. Клементьев; заявитель и патентообладатель Центр военно-технических проблем биологической защиты НИИМ МО РФ. – № 99100570; заявл. 10.01.1999; опубл. 10.08.2000.
6. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств // Ведомости Фармакологического Комитета. Приложение к журналу «Фарматика». 1998. № 1. С. 36–40.
7. Назаренко Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2002. 541 с.
8. Определение абсолютного количества субпопуляций лимфоцитов на световом микроскопе с использованием реагентов фирмы DYNAL (Норвегия). Иммунограмма методом магнитной сепарации: методическое пособие ЗАО «Биохиммак». М. 2005. 8 с.
9. Погорельский И.П., Лещенко А.А. Фитопатогенные псевдомонады как этиологический агент бактериозов сеянцев хвойных: выделение и характеристика биологических свойств // Матер. междунаrodn. научн.-практ. конф., посвящ. 85-летию ВНИИОЗ. Киров. 2007. С. 344–345.
10. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 6 марта 2007 г. № 10 «Об утверждении гигиенических нормативов ГН 2.2.6.2178-07» (с изменениями от 10 сентября 2007 г.). Введено в действие 1 декабря 2007 г.