

ВЛИЯНИЕ Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} НА АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА *TRICHODERMA ASPERELLUM SAMUELS* 1999

Куликов С.Н. (с.н.с.)^{1,2}, Лисовская С.А. (н.с.)¹, Хиад Х.Г. (студент)², Тюрин Ю.А.¹ (с.н.с.), Тазетдинова Д.И. (аспирант)², Тухбатова Р.И.² (аспирант), Глушко Н.И.¹ (с.н.с.), Алимова Ф.К.² (зав.каф. биохимии)

¹ФГУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Роспотребнадзор; ²ГОУ ВПО Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, Казань, Россия
©Коллектив авторов, 2008

Методом водной экстракции получены антигены промышленного штамма *Trichoderma asperellum Samuels*. Установлено, что на биохимический состав антигенов влияет присутствие в среде солей металлов. Наличие в среде $ZnSO_4$ приводит к более позднему спорообразованию. Отсутствие перекрестных серологических реакций с антигенами из других родов грибов подтверждает родоспецифичность *Trichoderma* spp.

Ключевые слова: антигены, перекрёстные реакции, соли металлов, *Trichoderma*

THE INFLUENCE OF Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} IN ANTIGENIC PROPERTIES OF INDUSTRIAL *TRICHODERMA ASPERELLUM SAMUELS* STRAIN 1999

Kulikov S.N.^{1,2}, (senior research collaborator), Lisovskaya S.A.¹ (research collaborator), Hiad H.G.²(student), Turin Iu.A.¹ (senior research collaborator), Tazetdinova D.I.² (post graduate student), Tuhbatova R.I.² (aspirant), Glushko N.I.¹ (senior research collaborator), Alimova F.K.²(chief of biochemistry chair)

¹Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; ²Kazan State University, Kazan, Russia

The soluble antigens of *Trichoderma asperellum Samuels* were prepared by water extraction from fungal biomass. The influence of some metal ions constituting in medium on biochemical contents of antigens have been studied. It was shown that $ZnSO_4$ modulate the spore formation a little later. Soluble antigens of *T. asperellum* had no cross serological reactivity against antigens of other fungal species.

Key words: antigens, cross reactivity, ions of metal, *Trichoderma*

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время многочисленными исследованиями доказано значение микогенной сенсibilизации в патогенезе аллергического ринита, бронхиальной астмы, аллергических бронхолегочных микозов, экзогенного аллергического альвеолита и атопического дерматита [1-3]. Сообщения о нереспираторных, пищевых или контактных видах аллергий, связанных с грибами, немногочисленны [4].

Несмотря на то, что *Trichoderma* spp. не относят к списку грибов, наиболее часто становящихся причиной аллергических заболеваний, тем не менее, сведения о потенциальной способности вызывать аллергические реакции представителями этого рода являются важными, поскольку использование данного микромицета в биотехнологической промышленности увеличивается с каждым годом. Триходерму используют в сельском хозяйстве для защиты растений от грибных болезней [5], в производстве ферментов, для утилизации отходов различного происхождения, биоремедиации почв от нефтяных и промышленных загрязнений, содержащих высокие концентрации солей металлов, в том числе тяжёлых [6].

В некоторых производствах, где культивируют микромицеты, имеется возможность возникновения микозов и микоаллергозов на фоне респираторной сенсibilизации людей спорами и фрагментами мицелия грибов. В 1 м³ воздуха производственных помещений содержится до 15 млн. спор, и работающие вдыхают за 6 часов 170–200 млн. спор [7]. Установлено, что в крупных берлинских библиотеках *Trichoderma* spp. являются одними из основных видов, циркулирующих в воздухе [8].

Кроме того, индивидуумы, имеющие аллергию к плесневым грибам, часто чувствительны к нескольким разновидностям плесневых грибов [9].

Вероятной причиной аллергических реакций считают антигенные компоненты, находящиеся на поверхности спор и в составе клеточной стенки. Большинство этих компонентов имеет гликопротеиновую природу, белковая часть которых ответственна за развитие гуморального иммунного ответа в макроорганизме, а углеводная составляющая обуславливает клеточный иммунный ответ и развитие гиперчувствительности замедленного типа.

В связи с вышеизложенным, интерес представляло получение антигенов из клеточных стенок *Trichoderma* spp., оценка влияния на состав антигенов наличия в среде для выращивания высоких концентраций металлов и исследование перекрёстных

реакций с другими грибами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали *Trichoderma harzianum* Persoon (sp. 18) и *T. asperellum* Samuels (sp. 302) из музея лаборатории экологической микробиологии Казанского Государственного Университета им. В.И. Ульянова-Ленина. *T. harzianum* был выделен из почвы, *T. asperellum* – производственный штамм, используемый в изготовлении препарата «Триходермин» (совхоз «Майский», Татарстан).

Для изучения влияния ионов металлов на рост и морфологию клеток и спор, грибы выращивали на агаризованной среде Чапека при температуре 28 °С в течение 5 суток. Использовали $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$ в концентрациях 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 и 0,8 мг/мл (концентрация соли приведена на безводную соль).

Для получения кроличьей гипериммунной поликлональной антисыворотки использовали производственный штамм *T. asperellum*. Биомассу гриба, выращенную в жидкой среде Чапека, отмывали от остатков питательной среды физиологическим раствором, растирали в ступке с физиологическим раствором, отделяли нерастворимые компоненты центрифугированием. Экстракт использовали для иммунизации кроликов по ранее предложенной схеме [10].

Для получения антигенов использовали штаммы *T. asperellum* и *T. harzianum*. Грибы выращивали в жидкой среде Чапека. *T. asperellum* выращивали также с добавлением солей металлов: $ZnSO_4$ – 0,4 мг/мл, $CuSO_4$ – 0,05 мг/мл, $FeSO_4$ – 0,025 мг/мл. Концентрацию солей предварительно подбирали по отсутствию ингибирующего эффекта на рост триходермы. Выращенную биомассу гриба отмывали от остатков питательной среды физиологическим раствором, высушивали ацетоном, экстрагировали антигены физиологическим раствором при встряхивании. Экстрагированные антигены затем осаждали этанолом.

Количество белка в антигене определяли по Брэдфорду, количество нуклеиновых кислот — по Спирину, содержание углеводов — с помощью 2%-ного раствора антрона в концентрированной серной кислоте [11].

Реакцию преципитации проводили по Ухтерлони в 1 %-ном агаре методом встречной иммунодиффузии. Оценку перекрёстных реакций триходермальной антисыворотки проводили с аллергенами 14 видов плесневых и дрожжеподобных грибов, изготовленных в Казанском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии (ВФС-42-20-92).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получены антигенные препараты из мицелия производственного штамма *T. asperellum* и природного штамма *T. harzianum*, а также гипериммунная кроличья антисыворотка к *T. asperellum*.

При выращивании двух штаммов грибов в жид-

кой среде Чапека, при одинаковом выходе сухой биомассы на объём питательной среды, выделенный из почвы природный штамм *T. harzianum* в составе экстрагируемых антигенов содержал вдвое большее количество белков и углеводов, чем производственный штамм *T. asperellum* (табл.). Поскольку именно экстрагируемые антигены грибов содержат наибольшее количество аллергенов, поэтому можно предположить, что промышленный штамм микромицета потенциально является источником меньшего количества веществ, способных вызывать аллергические реакции, по сравнению с природным штаммом.

Таблица

Влияние ионов металлов на выход биомассы и состав препарата антигенов

Штамм, соль металла	Выход сухой биомассы, г/л	Белок, мг/мл	Углеводы, мг/мл	Нуклеиновые кислоты, мг/мл
<i>T. harzianum</i> (контроль)	5,7	0,400	2,28	0,145
<i>T. asperellum</i> (контроль)	6,0	0,233	1,17	0,156
<i>T. asperellum</i> + $ZnSO_4$	7,6	0,366	2,32	0,114
<i>T. asperellum</i> + $CuSO_4$	3,2	0,300	1,22	0,480
<i>T. asperellum</i> + $FeSO_4$	3,0	0,275	1,5	0,780

Известно, что штаммы одного вида плесневых грибов обладают значительным сходством по антигенному составу, однако иногда отмечают различия в иммунологическом спектре, которые могут быть связаны с мутациями, особенностями биохимического состава среды, обуславливающие изменение синтеза отдельных клеточных компонентов [12]. Следовательно, можно ожидать, что антигенный, а также аллергенный состав триходермы будет иметь свои особенности и, в зависимости от области применения этого микромицета, где гриб растёт на разных по химическому составу средах, в присутствии повышенных концентраций солей металлов, в том числе тяжёлых, и токсичных веществ.

Исследовали влияние солей цинка, меди и железа как одних из часто встречающихся компонентов в составе промышленных отходов, подвергаемых биопереработке с использованием триходермы, на морфологию и антигенные свойства микромицета [6]. Было показано, что выращивание *T. asperellum* на среде, содержащей высокие концентрации солей металлов, влияло на морфологию гриба (Рис. 1). Если на агаризованной среде Чапека микромицет имел бесцветные мицелиальные клетки, округлые пигментированные споры, придающие колониям зелёный цвет, то присутствие повышенных концентраций сульфата меди приводило к развитию у колоний микромицета пигментации яркого сине-зелёного цвета, количество спор увеличивалось, споровые оболочки становились толще, сумки со спорами деформировались. Клетки мицелия оставались бесцветными и в них не наблюдали наличия каких-либо цветных включений. Максимальную стимуляцию спороо-

бразования наблюдали при концентрации сульфата меди 0,1 мг/мл. Высокая концентрация соли железа в питательной среде вела к изменению цвета колоний, которые становились буровато-зелёными за счёт внутриклеточных включений коричневого цвета. При концентрациях сульфата железа более 0,05 мг/мл наблюдали подавление роста мицелия и спорообразования. При наличии соли цинка отмечали обильный рост мицелия, увеличение толщины мицелиальных клеток. Спорообразование на 5 сутки инкубации практически отсутствовало (образование спор происходило на несколько суток позже), малое количество спор и пигмента обуславливало белую окраску колоний. Наибольший эффект стимуляции роста гриба наблюдали при концентрации сульфата цинка 0,8 мг/мл.

Состав экстрагируемых антигенов *T. asperellum* также зависел от присутствия в среде повышенных концентраций сульфатов цинка, меди и железа (таблица). Несмотря на уменьшение выхода сухой биомассы при выращивании гриба в среде с высоким содержанием солей меди и железа, во всех вариантах с металлами отмечали увеличение количества белка в экстрагируемых антигенах. Именно белковые составляющие экстрагируемых веществ обычно ответственны за возникновение аллергических проявлений у макроорганизма. Поэтому можно предположить, что триходерма, используемая для биоремедиации почв или отходов, которые содержат повышенные дозы солей этих металлов, будет обладать большей способностью вызывать аллергические заболевания.

Следует отметить, что, несмотря на высокий выход биомассы, высокое содержание белков и углеводов в экстрагируемых антигенах микромицета, аллергический потенциал гриба, растущего в среде с $ZnSO_4$, может оказаться ниже, чем у штаммов, выращиваемых в присутствии $CuSO_4$ и $FeSO_4$, при инкубации не более 5 суток. Это может быть связано с малым уровнем образования спор – важных агентов, вызывающих аллергические реакции у человека, способных перемещаться в воздушном потоке. Уменьшение спорообразования подтверждается микроскопией колоний микромицета и небольшим содержанием нуклеиновой кислоты в экстракте антигенов. Таким образом, в присутствии сульфата цинка аллергенный потенциал триходермы, вероятно, будет в большей степени связан с компонентами мицелиальных клеток. Однако спорообразование в присутствии сульфата цинка наблюдали при более длительном выращивании микромицета, что, наряду с большим количеством экстрагируемых антигенных компонентов, может придать культуре гриба потенциально высокую способность вызывать аллергические реакции у макроорганизма на более поздних

сроках инкубации.

Изменение профиля экстрагируемых антигенов при росте микромицета *T. asperellum* на среде с неорганическими солями подтверждено и при постановке реакции преципитации с антисывороткой (Рис. 2). Наличие дополнительных зон преципитации отмечали во всех вариантах солей, наибольшее количество которых наблюдали в антигенном экстракте гриба, выращенного в присутствии сульфата цинка. Появление дополнительных тонких полос преципитации в последнем варианте подтверждает их белковую природу. Данным методом также доказано отсутствие различий в антигенном спектре у производственного штамма *T. asperellum* и природного — *T. harzianum*.

Отмечено, что индивидуумы, имеющие аллергию к плесневым грибам, часто чувствительны и к некоторым другим видам плесневых грибов. Поэтому перекрёстное реагирование триходермальной антисыворотки с антигенами других родов грибов позволит с высокой вероятностью предположить наличие чувствительности человека к другому грибному роду при наличии аллергических реакций на триходерму. В реакции преципитации по Ухтерлони показано отсутствие перекрёстных реакций антигенов *T. asperellum* с аллергенами таких плесневых и дрожжеподобных грибов как: *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor pusillus*, *Neurospora sitophila*, *Penicillium digitatum*, *P. chrysogenum*, *P. tardum*, *Phoma betae*, *Rhizopus nigricans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyton rubrum*. Таким образом, антигены (аллергены) *Trichoderma* spp. являются родоспецифичными.

ВЫВОДЫ

1. Получены антигены производственного штамма *T. asperellum*, а также гомологичная гипериммунная кроличья антисыворотка.
2. Присутствие повышенных концентраций солей цинка, меди и железа в питательной среде влияло на морфологию клеток и спор, накопление биомассы, спорообразование, биохимический и антигенный составы экстрактов микромицета, что подтверждено образованием различных композиций экстрагируемых антигенов, выявляемых в реакции преципитации с антисывороткой.
3. Отсутствие перекрёстных серореакций экстрагируемых антигенов производственного штамма *T. asperellum* с антигенами других грибов и наличие таковых с природным штаммом *T. harzianum* подтверждает родоспецифичность антигенов (аллергенов) *Trichoderma* spp.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kurup V.P., Shen H.-D., Vijay H. Immunobiology of fungal allergens // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2002. — Vol. 129. — P. 181-188.
2. Zureik M., Neukirch C., Leynaert B., Liard R., Bousquet J., Neukirch F. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey // Brit. Med. J. — 2002. — Vol. 325, № 7361. — P. 411-414.
3. Lee S.K., Kim S.S., Nahm D.H., Park H.S., Oh Y.J., Park K.J., Kim S.O., Kim S.J. Hypersensitivity pneumonitis caused by *Fusarium napiforme* in a home environment // Allergy. — 2000. — Vol. 55, № 12. — P. 1190-1193.
4. Stricker W.E., Anorve-Lopez E., Reed C.E. Food skin testing in patients with idiopathic anaphylaxis // Allergy Clin. Immunol. — 1986. — Vol. 77, № 3. — P. 516-519.
5. Куликов С.Н., Алимова Ф.К., Захарова Н.Г., Немцев С.В., Варламов В.П. Биопрепараты с разным механизмом действия для борьбы с грибными болезнями картофеля // Прикл. Биохим. Микробиол. — 2006. — Т. 42, № 1. — С. 86-92.
6. Алимова Ф.К., Тазетдинова Д.И., Тухбатова Р.И. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. — Казань: Изд-во КГУ, 2007. — 230 с.
7. Кошкин В.С., Зайцева Г.А. Иммуногенетическая предрасположенность к аллергодерматозам у рабочих микробиологической промышленности // Современная микология в России. — М., Нац. Акад. Микол., 2002. — С. 361
8. Елинов Н.П. XXXI научная конференция немецкого микологического общества в г. Ахене (Германия) 18-21 сентября 1997 г. // Микология и фитопатология. — 1999. — Вып. 2 — С. 130-133.
9. Корнишева В.Г. Микозы кожи и подкожной клетчатки: Автореф. дисс...докт. мед. наук. — С-Пб., 1998. — 31 с.
10. Фрадкин В.А. Диагностические и лечебные аллергены. — М.: Изд-во МГУ, 1990. — 256 с.
11. Методы химии углеводов. / Под ред. Н.К. Кочеткова. — М.: «Мир», 1967. — 512 с.
12. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. биология дрожжей. — М.: Изд-во МГУ, 2004. — 221 с. Систематика дрожжевых грибов. // Эволюция и систематика грибов. — 1984 — С. 65-79.

Поступила в редакцию журнала 12.06.2008

Рецензент: Г.А.Бабенко

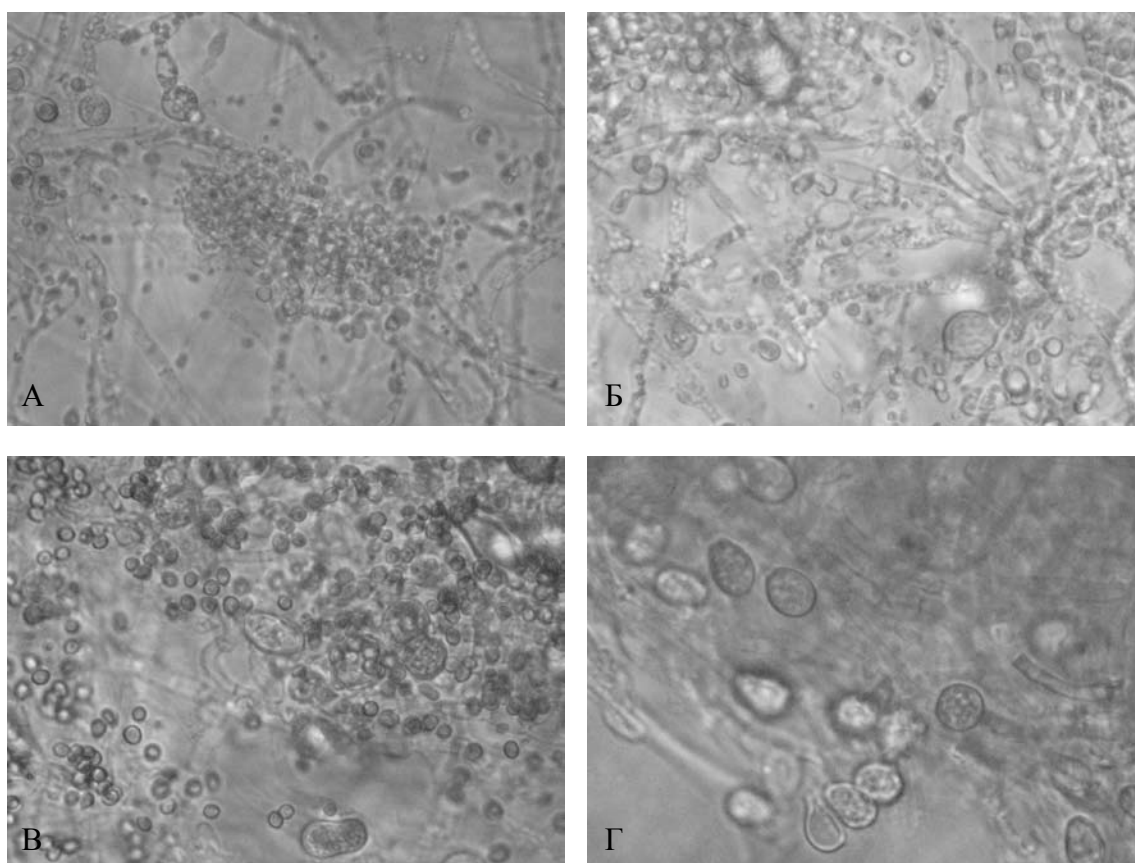


Рис. 1. Мицелии и споры *T. asperellum* на агаризованной среде Чапека в присутствии различных солей металлов (увеличение микроскопа $\times 400$). А – контроль; Б – на среде с CuSO_4 ; В – на среде с FeSO_4 ; Г – на среде с ZnSO_4

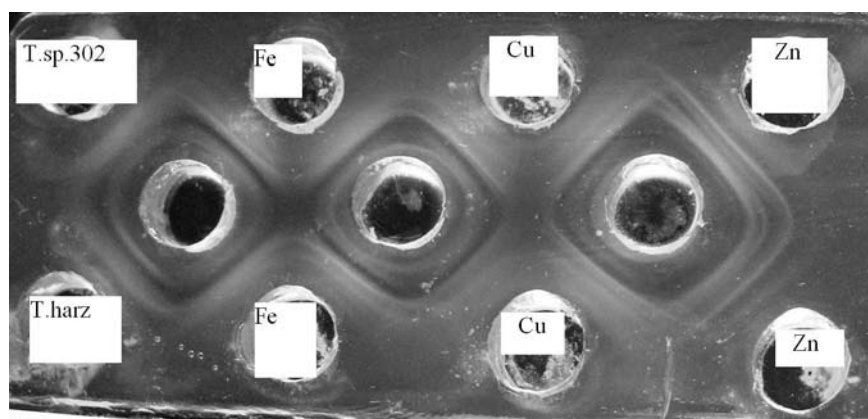


Рис. 2. Иммуная диффузия гипериммунной кроличьей антисыворотки (три лунки в центре геля) к антигенам *T. asperellum*.

T. sp. 302 – антигены производственного штамма *T. asperellum*;

T. harz — антигены природного штамма *T. harzianum*;

Fe — антигены *T. asperellum* выращенного на среде с FeSO_4 ;

Cu — антигены *T. asperellum* выращенного на среде с CuSO_4 ;

Zn — антигены *T. asperellum* выращенного на среде с ZnSO_4

