УСПЕХИ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том XXV

МАТЕРИАЛЫ ЮБИЛЕЙНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

Москва, 17-18 мая 2023 года

Москва
Национальная Академия Микологии
2023

ББК 28.591
УДК 576.3+582.28(083.71)+615.282.03-085
У78

Редакционная коллегия:

Сергеев Ю. В. (главный редактор)

Бурова С.А. (ответственный секретарь)

Кураков А.В.

Липницкий А.В.

Сергеев А.Ю.

Яковлев А.Б.

У78 **Успехи медицинской микологии.** — Т. 25. — М.: Национальная академия микологии, 2023. — 476 с.

ISBN 978-5-901578-37-7

В двадцать пятый том периодического издания «Успехи медицинской микологии» вошли заключительные восемь глав материалов Юбилейной конференции по медицинской микологии и микробиологии, посвященной памяти выдающихся ученых-микробиологов Зинаиды Виссарионовны Ермольевой (1898-1974) и Зинаиды Гавриловны Степанищевой (1913-2004). «Успехи медицинской микологии» выходят с 2003 г. и реферируются в Российском индексе научного цитирования (РИНЦ, доступны в полном тексте) и базе данных CrossRef. Международное название журнала: Advances in Medical Mycology. Архив сборника доступен по адресу http://www.mycosis.org

Издано в Российской Федерации в рамках программы и по рекомендации Ученого Совета Национальной академии микологии

© Национальная академия микологии, 2023

Глава 10

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКОЛОГИЯ

DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.10

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИКОБИОТЫ И МИКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ В ЖИВОТНОВОДСКИХ КОМПЛЕКСАХ

Алиев И.А.
Институт микробиологии Министерства Науки и Образования Азербайджана, Баку

В наше время быстрый рост население мира увеличивает их спрос на продукты питания, что приводит к такой глобальной проблеме, как нехватка продукты питания. Вот почему организация ФАО ООН определила развитие животноводства, являющегося одним из важнейших секторов сельского хозяйства, и повышение продуктивности в различных направлениях в качестве стратегических целей национальной политики мира.

В настоящее время в нашей республике построено большое количество современных животноводческих комплексов с учетом передовых технология, и в результате кропотливого труда опытных фермеров здесь выращивают как мясные, так и молочные породы скота. Однако в последнее время усиление антропогенного воздействия на окружающую среду стало причиной нарушения биоэкологического равновесия, что привело к активации гетеротрофного блока, в том числе грибов, особенно оппортунистических представителей [4;8]. Активированные оппортунистических патогенные представители микроскопических грибов, которые разными путями мигрируют во внутренную среду животноводческих комплексов, эндогенно или экзогенно заражают организмы содержащихся там животных и становятся возбудителями различных микотических патологий, приводя к значительному снижению продуктивности .

Аэродисперсная система воздушной среды помещений животноводческих комплексов неизбежно приводит к регулярной контаминации оппортунистических представителей микроскопических грибов, в том числе условно-патогенных, не только с животных, но и с работающими здесь людьми [1;2]. В результате у животных, содержащихся в животноводческих комплексах, а также у служащих наблюдаются дерматические микозы разной природы, аллергические заболевания, а также ряд второстепенных патологий[6;9]. Поэтому изучение микроскопических грибов распространенных в животноводческих комплексах, как факторов риска для жизни как животных, так и людей явилось основной целью исследований.

В качестве объекта для исследований были выбраны Билясуварский и Джалилабадский районы. Здесь в микологическом аспекте были

проанализированы животноводческие комплексы, построенные для содержание как буйволов, так и крупного рогатого скота, и здания стоила принадлежащие частным фермером. Для определения микобиоты, сформировавшейся в животноводческих зданиях, применяли методы как седиментации так и аппликации. Для инокуляции грибных спор применялись стандартные среды Чапека, Сабуро и Сусло-агар. Проведение экспериментов в 4-6 кратных повторностях приводит к получению чистых культур, что дает возможность для уточнения их видовой принадлежности при помощи идентификации грибов на основе их культурально-морфологических и эколо-физиологических свойств [3;5;7].

Частота встречаемости грибов выражается как стократное увеличение отношения исследуемых в микобиоте видов к их общему количеству.

Было выяснено, что в животноводческих комплексах в структурной организации сформировавшейся микобиоты участвуют 59 видов грибов из 14 родов. Из сравнительной характеристики по родовому составу микобиоты доминантное положение 3 родов, в том числе *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Так, род *Fusarium* 11 видов или же 18,6%, р.р. *Aspergillus* и *Penicillium* 9 видов или 30,6% в общей сложности составляют 49,2% от общей микобиоты. Роды *Microsporium*, *Mucor*, *Rhizopus* и *Trichophyton* каждый по 4 вида и в общей сложности 27,2%, *Alternaria* и *Trichoderma* каждый по 3 вида или же 10,2% представлены внутри микобиоты. Оставшейся роды, будучи по 1 или 2 вида, составляют 13,4% от общей микобиоты.

Стало известно, что, во внутренней среде животноводческих комплексах в результате дисбаланса экологических параметров активируется потенциальный патогенный состав микобиоты. Отметим, что, если состояние экологического дисбаланса в фермерском зданий будет долго продолжатся, то увеличится миграционная способность оппортунистических грибов в доминантное ядро микобиотыи создается реальная основа для возникновения потенциальных источников заражения. А это считается фактором риска для микологической безопасности в животноводческих комплексах. Поэтому прежде чем принимать какие-либо профилактические меры в хозяйственных постройках, необходимо определить тип патологии и степень вирулентности, проверить иммунный статус людей, вступающих в посредственный контакт с зараженными животными. Именно таким образом выявляются микотоксины и выясняются механизмы передачи патологий от животных к человеку.

В ходе исследования в качестве основных возбудителей выявленных патологий были определены нижеперечисленные потенциально-патогенные грибы: *Penicillium chrysogenum* как у животных, так и у людей

являются основными возбудителями систематических микозов, *Fusarium moniliforme* микотоксикозов, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus* аспергиллеза, *Mucor circinelloides* микозов, *Alternaria alternata* и *A. tenuissima* дерматофитозов, *Trichoderma viride* дерматитов, *Rhizopus nigricans* и *R. oryzae* микозов, *Claviceps paspali* судорожных токсикозов, *Trichophyton mentagrophytes* и *T. verrucosum* экзема, *Microsporium gypseum* и *M. canis* впадения волос или же облысения. Отметим, что в фермерских зданиях к у содержащихся там животных, так и у работающего там персонала для обеспечения их микологической безопасности очень важно. С этой целью в клинической практике используются отработанные эффективные препараты с антифунгальным действием, в том числе амфотерицин, нистатин, клотримазол, флуканазол, кетаконазол и другие. В то же время в животноводческих комплексах создаваемые санитарно-гигиенические условия, проводимые профилактические и эпидемиологические мероприятия, в том числе применение сильных дезинфицирующих препаратов с широким спектром действия биоцидных препаратов, как «Суксисан», «Сандим», «Фармайод», «Моноклавит», «Глутар», «Белетерил», «Витан», «Бромсент», «Аламикол», «Ветокуид». Также в ощутимой степени снижает степень биологического загрязнения внутри здания. После проведения в животноводческих зданиях дезинцирующих работ наблюдается уменьшение патогенного состава микобиоты в 2 раза, а его оппортунистическая деятельность переходит в потенциальную форму.

Таким образом, в животноводческих комплексах как содержащиеся там животные, так и служащие, заражаясь или непосредственно, или косвенным путем возбудителями патологий микологической природы превращаются в миконосителей. Стало известно, что у миконосителей патогенная активность этих грибов бывает довольно высокой. Однако применение против этих грибов биоцидных препаратов с антифунгальными действием их патогенную активность практически сводит к нулю. Другими словами, ломается эпизоотологическая цепочка, образующаяся этими грибами, и их миграция в человеческий организм, можно сказать, полностью останавливается. В противном случае вектор радиального распространения этих микологических патологий может быт достаточно широким и может стать очень серьезно медикосоциальной эпидемиологической проблемой.

Список литературы

1. Алиев И.А., Джабраилзаде С.М., Ибрагимов Э.А.Видовой состав и общая характеристика аэромикобиоты жилых зданий г. Баку // Современная микология в России. Москва, 2015, т. 4, вып. 2, с. 169-170

2. Алиев И.А., Гусейнова А.А. Некоторые особенности адгезии условно-патогенных грибов // Наука, образование, культура, 2018, № 6 (30), с. 5-8

3. Балюта А.А., Гончарова И.А., Иконникова Н.В.Оценка микологической безопасности жилых и общественных помещений / Современная микология в России. lll Съезд микологов России. Москва, 2012, том. 3, с. 209-210

4. Гуленкин В.М. Экономический ущерб от ряда особо опасных болезней сельскохозяйственных животных // Ветеринария, 2010, № 4, с. 8-12.

5. Кашкин П.Н., Хохряков М.К., Кашкин А.П. Определитель патогенных, токсигенных и вредных для человека грибов. Л., изд-во «Медицина», 1979, 270 с.

6. Лисовская С.А., Халдеева Е.В., Глушко Н.И. Возрастающая значимость плесневых грибов как агентов вторичных инфекции // Успехи медицинской микологии.2014, с. 191-193

7. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. М., «Мир», 2001, 468 с.

8. Douglas J. FAO response: Food-and-muth dissease in Mongolia in 2010 // EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletein. 2011, N 37, p. 18-20.

9. Latge G.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis // Clinical Microbiology. Rewews, 1999, vol. 12, N 2, p. 310-350

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРОТИВОГРИБКОВОГО СРЕДСТВА

Черных Т.Ф., Флисюк Е.В., Шульц А.В., Богданова О.Ю.
Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

Инфекционные заболевания у животных могут возникать внезапно и наносить значительный ущерб [1]. Из болезней инфекционной этиологии чаще регистрируются грибковые заболевания, в частности дерматофитозы (микроспария, трихофития и фавус) [2].

В возникновении кожных заболеваний большую роль играет низкая резистентность организма, хроническое течение ряда вирусных и паразитарных инфекций, неблагоприятные экологические факторы, наличие эктопаразитов, неудовлетворительные санитарно-гигиенические условия в местах содержания и выгула животных [3]. Несмотря на существование многочисленных современных наружных и системных фармакологических средств, их терапевтическая эффективность остается

достаточно низкой, поэтому проблема лечения дерматомикозов по-прежнему актуальна не только для ветеринарии, но и для медицины.

Следовательно, разработка и оценка эффективности новых противогрибковых препаратов для наружного применения является актуальной задачей для ветеринарной науки и практики.

Ранее [3] проводили исследования нового синтетического соединения из группы тиазолов на противогрибковую активность по отношению грибам рода *Trichophyton – Tr. verrucosum*, *Tr. gypseum* и *Tr. equinum* методом серийных разведений на среде Сабуро. Было доказано, что вещество обладает фунгицидной активностью в отношении дрожжевых и мицелиальных грибов (МФК – 3,9-7,8 мг/мл).

Нами были разработаны гели в концентрации основного действующего вещества 1-5%. Изучены технологические, биофармацевтические, микробиологические показатели, а также безопасность и терапевтическая эффективность, на основании проведенных оценок была выбрана концентрация геля – 3%.

Целью дальнейших исследований явилось изучение терапевтической активности гели. Терапевтическую эффективность определяли на больных животных, пораженных грибковыми болезнями в условиях ветеринарных клиник (боксы). Для определения типа возбудителя, патологический материал был взят из поражённых участков кожи и подвергался гистологическими методами исследования. Лечение больных животных проводили в изолированных условиях, соблюдая меры безопасности. Для лечения использовали следующую схему лечения: пораженные места обрабатывали гелю, втирая его в пораженные места от периферии к центру, захватывая до 1 см здоровых пограничных участков. До полного выздоровления животного обработку проводили 2-3 раз в течение 24 часов на протяжении 10-15 дней. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Терапевтическая эффективность препарата.

Показатели	**Начало лечения**	**На 5-й день**	**На 10-15-й день**
Внешний вид	Очаги разрушения в виде круглых пятен, покрыты чешуёй Волосы хрупкие и легко выпадают (+++)	Круглые пятна, начинают исчезать (++) Волосы обретают свою структуру +)	Отсутствие признаков заболевания (-)
Общее состояние	Средней тяжести	Удовлетворительное	Удовлетворительное

Показатели	Начало лечения	На 5-й день	На 10-15-й день
Лабораторная диагностика	Положительная (+)	+ - у 2 животных + - - у 1 животного - - у 4 животных	Отрицательная

Примечание: (+++) сильно выраженные, (++) умеренно выраженные, (+) слабо выраженные признаки, (–) отсутствие в ране клинических признаков;

Таким образом, на основании проведенных исследований можно предположить, что разработанная нами лекарственная форма – гель обладает специфическим терапевтическим эффектом при поражении кожи мелких лабораторных животных грибом рода *Trichophyton mentagrophytes*.

Список литературы

1. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин и др. Под ред. А.А. Сидорчука. - М.: Издательство Колос С. 2007. С. 472-479.
2.. Захарова, Т.П. К вопросу о резистентности организма и способах её повышения / Т.П. Захарова, К.А. Сидорова // Молодой учёный. 2015. № 65. С. 123- 124.
3. Шульц, А. В Исследование нового противогрибкового вещества в опытах IN VITRO /А. В. Шульц, Т.Ф. Черных, А.М. Лунегов, Е.В Флисюк // Журнал «Иппология и ветеринария». 2022. № 2 (т.44). С. 213-219

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «ТРАМЕТИН+»

[1,2]Чхенкели В.А., [1,2]Чхенкели Г.Д., [3]Никонова А.А.
[1]ООО «Биотехвет», Иркутск
[2]Иркутский государственный университет,
[3]Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

Ветеринарный препарат «Траметин+» является ветеринарным препаратом для профилактики ассоциированных желудочно – кишечных и респираторных болезней молодняка сельскохозяйственных животных, получаемый на основе культуральной жидкости при

жидкофазном культивировании продуцента *Trametes pubescens* (*Shumach. Fr.*)*Pilat.* штамм 0663 из Коллекции БИН РАН им. Л.Л. Комарова [1-5].

До настоящего времени имеются сведения об особенностях липогенеза и составе липидов низших грибов, в то время как для высших грибов, в частности базидиомицетов, аналогичные данные практически отсутствуют. Состав свободных жирных кислот базидиомицетов рода является мало изученным. Исследования ограничиваются единичными работами по изучению липидов плодовых тел [6-12]. Однако достаточно хорошо известно, что жирные кислоты обладают фармакологической активностью в отношении различных нозологий. Определение жирных кислот в составе препарата проводили по методике Никоновой А.А. с соавт. [13]. Подготовка препарата для анализа включала экстракцию липидов и получение метиловых эфиров. Липиды экстрагировали из параллельных навесок смесью Фолча (хлороформ–метанол, 2 : 1, по объему). Экстракты анализировали на хромато-масс-спектрометре "6890B GC System, 7000C GC/MS Triple Quad" (Agilent, США) с колонкой Optima-17 (30 м 0.25 мм, 0.25 мкм) фирмы "Macherey-Nagel" (Германия).

Проведен анализ свободных жирных кислот (СЖК), этерифицированных жирных кислот (ЭЖК) и общих жирных кислот (ОЖК) ветеринарного препарата «Траметин+» в форме их метиловых эфиров (МЭ). Среди них проанализированы насыщенные жирные кислоты (НЖК), мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК) и полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК).

Всего в составе проб ветеринарного препарата «Траметин+» идентифицировано 18 жирных кислот. Из них 12 насыщенных ЖК, 5 - мононенасыщенных ЖК и одна полиненасыщенная незаменимая -6 полиненасыщенная линолевая кислота, представленная в минимальных количествах. Определены хроматографические характеристики идентифицированных кислот, качественный и количественный состав (табл. 1). На долю этерифицированных кислот, то есть кислот, которые находятся в препарате в связанной форме в качестве кислотных остатков триглицеридов и фосфолипидов, приходится 45 % всех жирных кислот препарата. На долю свободных несвязанных жирных кислот приходится 55 % всех ЖК препарата "Траметин+" (табл. 1).

Основная доля всех жирных кислот препарата (82 %) приходится на насыщенные ЖК. На долю мононенасыщенных ЖК приходится 16 % всех кислот, на долю полиненасыщенных ЖК – 2% (табл. 1). Наблюдается перераспределение в составе ЖК в зависимости от степени их насыщенности между свободными и связанными кислотами. Так для свободных кислот на долю насыщенных ЖК приходится 67%, а на долю ненасыщенных – 33 %; для связанных кислот на долю насыщенных ЖК приходится 82%, а на долю ненасыщенных – 18 %. Отмечено преобладание ненасыщенных кислот в свободной неэтерифицированной форме.

Из таблицы (табл. 1) видно, что средняя концентрация жирных кислот в препарате «Траметин+» составляет ~70 мкг/г препарата. Концентрация насыщенных ЖК составляет ~57 мкг/г. Концентрация ненасыщенных ЖК составляет ~12

мкг/г. Концентрация свободных ЖК составляет ~41 мкг/г, концентрация этерифицированных ЖК ~34 мкг/г препарата. Процентное содержание жирных кислот также приведено (табл. 1).

Проведенный количественный анализ жирных кислот ветеринарного препарата «Траметин+» свидетельствует о том, что суммарная концентрация жирных кислот составляет 70 мкг/г препарата.

Таблица 1. Качественный и количественный (мкг/г) состав жирных кислот препарата «Траметин+».

№ п/п	Жирные кислоты	Содержание жирных кислот в препарате «Траметин+», мкг/г препарата									
		Номера проб						Среднее содержание			
		1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	ОЖК[1]	ЭЖК	СЖК	ОЖК[2]
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Додекановая кислота (лауриновая)	0.099	0.098	0.091	0.127	0.031	0.709	0.099	0.109	0.370	0.478
2	Тридекановая кислота (тридециловая)	0.122	0.121	0.000	0.000	0.045	0.145	0.121	0.000	0.095	0.095
3	Изо-тетрадекановая кислота	0.444	0.439	0.226	0.237	0.280	0.696	0.441	0.232	0.488	0.720
4	Анти-изо-тетрадекановая кислота	0.234	0.232	0.299	0.274	0.067	0.146	0.233	0.287	0.106	0.393
5	Тетрадекановая кислота (миристиновая)	3.317	3.284	1.107	1.031	0.890	3.325	3.301	1.069	2.108	3.177
6	Изо-пентадекановая кислота	3.835	3.797	6.659	5.886	0.132	0.451	3.816	6.272	0.291	6.564
7	Анти-изо-пентадекановая кислота	6.221	6.159	10.26	9.481	0.252	0.984	6.190	9.871	0.618	10.49
8	Пентадекановая кислота (пентадециловая)	1.642	1.626	0.290	0.320	0.363	1.238	1.634	0.305	0.800	1.106
9	Цис-11-гексадеценовая кислота	2.951	2.921	0.852	0.810	1.601	3.397	2.936	0.831	2.499	3.330
10	Цис-9-гексадеценовая кислота (пальмитолеиновая)	1.090	1.079	1.629	1.287	0.426	0.621	1.085	1.458	0.524	1.982
11	Гексадекановая кислота (пальмитиновая)	28.57	28.29	8.270	7.760	7.33	23.57	28.428	8.016	15.45	23.46
12	Гептадеценовая кислота (маргариновая)	1.077	1.066	1.365	1.061	0.193	0.164	1.071	1.213	0.179	1.392
13	Цис, цис-9, 12-октадекадиеновая кислота (линолевая)	1.161	1.150	0.555	0.505	0.932	1.771	1.156	0.530	1.352	1.881
14	Цис-11-октадеценовая кислота (цис-вакценовая)	6.047	5.987	2.038	1.878	4.801	10.37	6.017	1.958	7.586	9.544

Таблица 1. Продолжение.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
15	Цис-9-октадеценовая кислота (олеиновая)	0.550	0.544	0.318	0.289	0.367	0.830	0.547	0.304	0.598	0.902
16	Октадекановая кислота (стеариновая)	10.71	10.60	1.691	1.580	3.330	9.605	10.65	1.636	6.468	8.103
17	Эйкозановая кислота (арахиновая)	0.735	0.727	0.000	0.000	0.177	0.413	0.731	0.000	0.295	0.295
18	цис-13-докозеновая кислота (эруковая)	0.589	0.583	0.000	0.000	0.834	1.288	0.586	0.000	1.061	1.061
19	Сумма	69.39	68.70	35.65	32.53	22.05	59.72	69.05	34.09	40.88	74.97
20	НЖК	57.00	56.44	30.26	27.76	13.09	41.44	56.72	29.01	27.26	56.27
21	МНЖК	11.23	11.11	4.838	4.265	8.030	16.51	11.17	4.551	12.27	16.82
22	ПНЖК	1.161	1.150	0.555	0.505	0.932	1.771	1.156	0.530	1.352	1.881

Примечание: пробы 1.1, 1.2. – МЭ ЖК препарата «Траметин»; пробы 2.1, 2.2 – – экстракты МЭ; пробы 2.1 , 2.2 - экстракты метиловых эфиров СЖК; ОЖК1 – общее содержание жирных кислот (свободных и этерифицированных), полученное прямым способом; ОЖК2 – общее содержание жирных кислот (свободных и этерифицированных), полученное суммированием значений содержаний СЖК и ЭЖК в пробах

Из них около 50 % приходится на свободные жирные кислоты, большинство из которых обладают мощным антибактериальным, противовирусным, противоопухолевым действием, в то время как этерифицированные (связанные) кислоты, на долю которых приходится 50 % от общей массы жирных кислот, в большей степени, обладают обволакивающим и противовоспалительным действием. В то же время незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты в препарате практически отсутствуют.

Спектр жирных кислот препарата «Траметин+» определяет уникальные свойства препарата, которые показаны при проведении лабораторных исследований, так и при проведении научно – хозяйственных

экспериментов в хозяйствах Иркутской области.
Работа выполнена при финансовой поддержке «Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере».

Список литературы

1. Чхенкели В.А. Калинович А.Е. Шкиль Н.А. Эколого – биологическое обоснование использования препарата траметин в ветеринарной практике: монография. Москва: Перо, 2015,126 с.
2. Чхенкели В.А., Романова Е. Д., Власов Б.Я. Профилактика негативного воздействия экологических факторов на организм молодняка сельскохозяйственных животных и птицы с использованием ветеринарного препарата Траметин: монография. LAP Lambert Academic Publshing RU, Mauritius 2020, 121с.
3. Чхенкели В.А. Механизмы действия препарата Траметин на организм животных при ассоциированных инфекциях: монография. СПб: Проспект науки, 2020 ,176 с.
4. Чхенкели В. А. Препараты последнего поколения на основе грибов-ксилотрофов рода Trametes: обнаруженные эффекты, механизмы действия и применение: монография Москва: Перо, 2014,126 с.
5. Чхенкели В.А., Уланская А.В. Сальмонеллёз как биологический фактор в экотехсистеме и его профилактика с использованием ветеринарного препарата “ Траметин”: монография. Иркутск: Изд - во ИГУ, 107 с.
6. Falk-Petersen S., Sargent J.R., Henderson J. et al. Lipids and fatty acids in ice algae and phytoplankton from the Marginal Ice Zone in the Barents Sea // Polar Biol. 1998. V. 20, p. 41.
7. Феофилова Е.П., Бурлакова Е.Б., Кузнецова Л.С. Значение реакции свободного окисления в регуляции роста и липидообразования эукариотных и прокариотных организмов // Прикл. биохим. и микробиол. 1987. Т.23, № 1, с. 3–13.
8. Феофилова Е.П., Горнова И. Б., Меморская А. С. с соавт. Липидный состав плодовых тел и глубинного мицелия *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) // Микробиология. 1998. Т.67, № 5, с. 655–659.
9. Бабицкая В.Г., Черноок Т.В., Щерба В.В. с соавт. Характеристика липидов глубинного мицелия грибов // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2. Химия. Биология. География. 2009. Т. 4. Ч. 1,с. 101.
10. Лощинина Е.А., Цивилева О.М., Макаров О.Е. с соавт. Изменение углеводного и жирнокислотного состава мицелия *Lentinus edodes* при совместном культивировании Azoprifilum brasi*lense* //Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология, 2012, №2(3), с.64-67;

11. Цуркан Я.С. Селекция микроорганизмов с высоким содержанием практически значимых полиненасыщенных жирных кислот: дисс. на соиск. уч. степени д –ра философии. Алма –Аты, 2015,195 с.
12. Цивилёва О.М., Нгуен Т.Ф., Ву Л.Н. с соавт. Липидные компоненты пигментированного и глубинного мицелия *Ganoderma* разных климатических зон// Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология, 2015, №3(14), с. 37 -47.
13. Никонова А.А., Шишлянников С.М., Шишлянникова Т.А. с соавт. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в гидробионтах с различным содержанием полиненасыщенных кислот методом газожидкостной хроматографии// Журнал аналитической химии. 2020. Т. 75, № 10, с. 907 920.

ПАТОГЕННЫЕ ВИДЫ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Глотова Т.И., Судоргина Т.И., Котенева С.В., Глотов А.Г., Велькер Д.А., Нефедченко А.В.

Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий СО РАН , Краснообск

Клостридии представляют собой разнообразную группу спорообразующих грамположительных анаэробов, включающую несколько патогенных видов. Они способны вызывать кишечные, нейротоксические или гистотоксические инфекции. Наиболее распространенными среди животных и людей являются кишечные инфекции, вызванные *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile*. Необходимо учитывать тот факт, что некоторые виды клостридий могут быть обнаружены в окружающей среде и в кишечнике человека и животных в виде нормальной флоры [1], поэтому все выделенные культуры бактерий необходимо тестировать на патогенность. Факторами патогенности у клостридий являются токсины. У бактерии *C. perfringens* выявлено пять токсинотипов (A, B, C, D и E) на основании способности кодировать четыре токсина: альфа, бета, эпсилон и йота [2]. Недавно к ним были добавлены два дополнительных типа F и G [3].

C. perfringens типа A вызывает синдромы поражения кишечника у млекопитающих, включая энтероколит у свиней и лошадей, энтеротоксемию у овец и крупного рогатого скота [4] и абомазит у крупного рогатого скота, овец и коз [5].

Заболевания, вызываемые *C. perfringens* типа C у людей и животных, сопровождаются некротизирующим или некрогеморрагическим

энтеритом и/или энтероколитом. Они чаще всего встречаются у новорожденных нескольких видов животных: овец, крупный рогатый скот, лошадей и свиней. Риск заболевания новорожденных животных обусловлен тем, что бета-токсин, продуцируемый *C. perfringens* типа С, чувствителен к действию трипсина и другим протеолитическим ферментам, таким как химотрипсин, а молозиво оказывает ингибирующее действие на трипсин. Оно направлено на предотвращение протеолитического распада иммуноглобулинов в первые дни жизни животного, что с другой стороны защищает бета токсин от разрушения [6]. *C. perfringens* типа D вызывает энтеротоксемию у овец, коз и крупного рогатого скота [1, 7]. В литературе сообщается о кишечных инфекциях, вызванных *C. difficile*, у людей и животных [8,9]. Другие виды клостридий, в том числе *Clostridium sordellii*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* и другие, являются причиной кишечных токсикоинфекций у животных и/или людей [1, 10]. *Clostridium botulinum* может вызывать токсикоинфекции у крупного рогатого скота [11].

В настоящее время признанными этиологическими агентами клостридиозов крупного рогатого скота являются: *Clostridium chauvoei* (эмфизематозный карбункул), *Clostridium novyi* тип А, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordelli* (злокачественный отек), *Clostridium novyi* тип D или *Clostridium haemolyticum* (бациллярная гемоглобинурия крупного рогатого скота), *Clostridium tetani* (столбняк), *Clostridium novyi* тип С (хронический остеомиелит буйволов), *Clostridium perfringens* тип Е, *Clostridium perfringens* тип D (анаэробная энтеротоксемия телят), *Clostridium perfringens* тип С (геморрагическая энтеротоксемию телят), *Clostridium perfringens* тип А (злокачественный отек, газовая гангрена, некротизирующие энтериты, метриты, мастит крупного рогатого скота), *Clostridium septicum*, *Clostridium oedematiens*, *Clostridium histolyticum* (злокачественный отек, брадзотоподобные инфекции крупного рогатого скота) [12-13].

Цель работы – изучить роль патогенных видов клостридий в патологии крупного рогатого скота на крупных молочных комплексах и животноводческих фермах Сибири.

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии — диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ИЭВСиДВ) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) и животноводческих хозяйствах Новосибирской, Омской и Томской областей, Алтайского края.

Для бактериологических исследований отбирали пробы биологического материала от крупного рогатого скота разных половозрастных групп,

которые замораживали однократно и транспортировали в лабораторию в течение не более 4…12 ч в термосе со льдом с целью исключения повторного оттаивания и замораживания.

Всего исследовали 451 пробу биологического материала от телят в возрасте от трех дней до 6 мес и от абортированных плодов (кровь, средостенные и брыжеечные лимфатические узлы, легкие, печень, селезенка, сычуг, кишечник), от коров – влагалищные выделении, мышечная ткань, кровь, молоко, надвыменные и брыжеечные лимфатические узлы, рубец и кишечник.

Проводили бактериологические исследования проб биологического материала согласно ГОСТа 26503-85 «Методы лабораторной диагностики клостридиозов». Для этих целей использовали искусственные жидкие и плотные питательные среды: тиогликолевую, кровяной мясо-пептонный агар (КМПА), агар Шедлера, Clostridial Agar (HiMedia). При изучении фенотипических свойств у выделенных культур бактерий обращали внимание на макро – и микро морфологию, а биохимическую идентификацию культур бактерий проводили при помощи набора реактивов АНАЭРОтест 23, MICROLATEST (Чехия). Для определения токсигенных свойств выделенных культур бактерий использовали беспородных белых мышей массой 18...20 г и подкожный метод заражения.

В результате исследований бактерии рода *Clostridium* удалось выделить из 39 (8,4%) проб биоматериала. В результате определения фенотипических и биохимических свойств идентифицировали пять видов бактерий рода *Clostridium*: *Clostridium septicum* – 10 изолятов; *Clostridium histolyticum* – 11, *Clostridium perfringens* – 12; *Clostridium sordelli* – 3 и *Clostridium. novyi* тип А – 3 изолята.

Бактерии пяти видов (*Clostridium septicum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordelli* и *Clostridium novyi* типа А) были выделены из печени, селезенки и лимфатических узлов, трех видов (*Clostridium. septicum*, *Clostridium perfringens* и *Clostridium sordelli*) – из мышечной ткани и сычуга. Эти пробы биоматериала были отобраны от животных с кишечной формой инфекции. Из проб молока от коров с маститом изолировали *Clostridium septicum* и *Clostridium histolyticum*, из влагалищных выделений коров с эндометритом – *Clostridium septicum* и *Clostridium histolyticum*. Все выделенные культуры бактерий были в той или иной степени токсигенными для белых мышей.

В результате бактериологических исследованиях проб биологического материала от павших или вынужденно убитых животных чаще всего изолировали *Clostridium septicum*, *Clostridium histolyticum* и *Clostridium perfringens*, что соответствует данным, полученным другими исследователями [14]. В тоже время другие авторы в последние годы чаще

всего сообщают о выделении от телят *Clostridium difficile* [15-18]. Споры данного вида бактерии высоко устойчивы к нагреванию и высыханию, поэтому способны длительное время сохранять жизнеспособность в окружающей среде [19], в том числе в экскрементах грызунов, которые могут обитать на животноводческих фермах [17].

В результате проведенных исследований установлено, что клостридиозы крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Сибири чаще протекают в виде смешанных инфекций, чем в моноварианте. Они являются причиной заболеваемости и падежа телят одновременно с вирусными и бактериальными инфекциями крупного рогатого скота. В наших исследованиях клостридии выделяли из проб биоматериала, в которых одновременно присутствовали вирусы инфекционного ринотрахеита и коронавирусной инфекции крупного рогатого скота, а также бактерии рода *Salmonella*. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что возможно внутриутробное или раннее постнатальное заражение телят этими возбудителями. Кроме того, инфицирование телят может происходить через молоко, молозиво, подстилку, предметы внешней среды, контаминированные фекалиями взрослых животных.

От коров были выделены высоко токсигенных клостридии, что является свидетельством циркуляции данных бактерий среди маточного поголовья стада. Для них источником возбудителя могут быть контаминированные корма, почва, вода, могут способствовать ацидозы рубца и кетозы. Выделение бактерий рода *Clostridium* является подтверждением снижения резистентности организма животных и нарушения обмена веществ. При септической форме инфекции возбудитель может проникать в матку с током крови, что приводит к внутриутробному заражению телят, абортам, метритам и эндометритам.

Таким образом, клинические признаки и течение клостридиозов у крупного рогатого скота зависели от вида возбудителя и его ассоциаций с другими микроорганизмами. У телят регистрировали острую септическую и кишечную формы, а у коров аборты, эндометриты, маститы.

Благодарность: работа выполнена в рамках гранта РНФ соглашение №23-26-00009 от 13.01. 2023 г.

Список литературы

1. Uzal F.A. Diseases produced by *Clostridium perfringens* type A in mammalian species. In: Uzal F.A., Songer J.G., Prescott J., Popoff M., editors Clostridial diseases of animals. Willey and Blackwell; Ames IA: 2016. 109–116.

2. Diab S.S., Uzal F.A., Songer J.G. Diseases produced by *Clostridium difficile*. In: Uzal, FA, Songer, JG, Prescott, J, Popoff, M, editorsClostridial diseases of

animals. Willey and Blackwell; Ames, IA: 2016. 177–195.

3. Uzal F.A. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. Anaerobe. 2004; 10:135–143.

4. Rood J.I., Adams Adams V., Lacey J. et al. Van Immerseel F. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. Anaerobe. 2018.

5. Prescott J.F., Menzies P.I., Fraser R.S. Clostridial abomasitis. In: Uzal, FA, Songer, JG, Prescott, J, Popoff, M, editorsClostridial diseases of animals. Willey and Blackwell; Ames IA: 2016. 205–242.

6. Diab S.S., Kinde H., Moore J. et al. Pathology of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia in horses. Vet Pathol. 2012; 49:255–263.

7. Uzal F.A., Songer J.G. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J Vet Diagn Invest. 2008; 20:253–65.

8. Burke K.E., Lamont J.T. *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. Gut Liver. 2014;81:1–6.

9. Rineh A., Kelso M.J., Vatansever F., Tegos G.P., Hamblin M.R. *Clostridium difficile* infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014; 12:131–50.

10. Leffler D.A., Lamont J.T. *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 2015;372:1539–48.

11. Le Marechal C., Woudstra C., Fach P. Clostridial diseases of animals. Uzal, FA, Songer, JG, Prescott, J, Popoff, M, editorsWilley and Blackwell; Ames IA: 2016. 303–330.

12. Глотова Т.И., Терентьева Т.Е., Глотов А.Г. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота к клостридиозам. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2017; 47(1): 90–96.

13. Терентьева Т.Е., Глотова Т.И., Котенева С.В., Глотов А.Г. Видовой спектр бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах. Российский ветеринарный журнал. 2016; 1: 5–8.

14. Капустин А.В., Моторыгин А.В., Букова Н.К. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота. Вестник ветеринарии. 2013; 1(64): 71–73.

15. Rodriguez C., Hakimi D.E., Vanleyssem R. et al. *Clostridium difficile* in beef cattle farms, farmers and their environment: Assessing the spread of the bacterium. Vet Microbiol. 2017; 210: 183–187.

16. Hampikyan H., Bingol E.B., Muratoglu K., Akkaya E., Cetin O., Colak H. The prevalence of *Clostridium difficile* in cattle and sheep carcasses and the antibiotic susceptibility of isolates. Meat Sci. 2018; 139: 120–124.

17. Rodriguez C., Taminiau B., Van Broeck J., Avesani V., Delm e M., Daube G. *Clostridium difficile* in young farm animals and slaughter animals in Belgium. Anaerobe. 2012; 18(6): 621–625.

18. Abay S., Ahmed E.F., Aydin F., Karakaya E., M tak H.K. Presence of

Clostridioides *difficile* in cattle feces, carcasses, and slaughterhouses: Molecular characterization and antibacterial susceptibility of the recovered isolates. Anaerobe. 2022; 75: 102575.

19. Connor M., Flynn P., Fairley D., Marks N. et al. Evolutionary clade affects resistance of *Clostridium difficile* spores to cold atmospheric plasma. Sci. Rep. 2017; 7: 41814.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ НА АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПАТОГЕНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЫБ

Хамидова Х.М., Азимова Н.Ш., Каримов Х.Х., Миралимова Ш.М.
Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

С давних времен рыбоводство является одним из главных источников питания человечества. Улучшение качества и увеличение объема производства рыбы, при соблюдении рационального использования рыбных ресурсов, возможно только при условии повышения интенсивности технологий производства. Промышленность аквакультуры является одним из наиболее быстро растущих продовольственных секторов производства в мире. В условиях сложившейся экологической ситуации, истощения природных ресурсов, объектом пристального внимания многих стран, даже имеющих выход к морю, становится развитие аквакультуры, т.е. выращивание рыбы и водных организмов в искусственных условиях (1).

Специализированные прудовые хозяйства имеют важное значение, основным условием повышения эффективности рыбоводства в прудах служит рациональное использование материальных ресурсов – кормов, удобрений, а также профилактика болезней и гибели рыб. (2,3).

Для повышения продуктивности индустриального рыбоводства особое место отводится профилактике болезней и лечению рыб, поскольку при выращивании рыб в установках замкнутого водоснабжения условно-патогенная микрофлора в воде может перейти в патогенную, резистентную форму и вызвать заболевания различной этиологии. Качественный состав микробиоценоза рыб имеет большое значение, поскольку доминирование условно-патогенной и патогенной микрофлоры на фоне ослабления защитных возможностей макроорганизма, может привести к началу эпизоотии (4).

Как правило, основными средствами борьбы с инфекционными заболеваниями бактериальной природы являются антибиотики и химиотерапевтические препараты. Однако обилие указанных препаратов часто сопровождается их бессистемным использованием, что не только снижает эффективность применения

антимикробных препаратов, но и приводит к ряду побочных эффектов. В результате их применения особую проблему вызывает также распространение резистентных форм патогенных микроорганизмов, устойчивых к действию современных антибиотиков и накоплению их активных веществ в организме (5,6). При употреблении этой продукции в пищу у человека могут возникать пищевые токсикоинфекции и токсикозы, к тому же рыбы, обладают особой биологической способностью концентрировать из воды большое количество опасных токсических веществ, причем их содержание в организме рыб гораздо больше чем в воде (7), именно это послужило запретом на применение антибиотиков во многих странах (8).

В последнее время вместо антибиотиков начали применять пробиотики (9,10), содержащие в своем составе живые микроорганизмы нормальной микрофлоры кишечника или микроорганизмы, способствующие её формированию. Пробиотики помогают в усвоении питательных веществ, способствуют послестрессовой адаптации, повышают резистентность макроорганизма к патогенным микроорганизмам, и, в целом, улучшают работу пищеварительной системы за счет дополнительной продукции ферментов в пищеварительном тракте. Первые препараты пробиотиков были созданы на основе молочнокислых- и бифидобактерий. В настоящее время ассортимент микроорганизмов пробиотических препаратов расширен. Многие пробиотики, к которым относятся молочно-кислые, бифидобактерии и некоторые споровые культуры, способны подавлять патогенную и условно-патогенную микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), тем самым способствуя её нормализации (11,12).

Пробиотические препараты, состоящие из молочнокислых и споровых культур «Споробактерин», «Бактилсубтил», «Витаспор» и др. спокойно переносят градиент «кислотности/щелочности» ЖКТ и не снижают своей численности, способны приживаться в кишечнике и проявлять антагонистическую активность к *Candida albicans*, *S. aureus*. *E. coli* и др. (13).

В Узбекистане в результате постоянного внимания к внедрению современных технологий достигается стабильное развитие всех отраслей сельского хозяйства. В частности, расширение сферы рыбоводства в стране способствует обеспечению населения экологически чистыми и полезными продуктами. Пробиотические препараты практически не используются или очень редко применяются в животноводстве, рыбоводстве.

Цель настоящего исследования – изучение антагонистической активности местных штаммов лакто-, бифидо- и споровых бактерий и отбора наиболее активных штаммов для использования в перспективе в качестве основы пробиотических препаратов.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований служили условно-патогенные микроорганизмы, выделенные из образцов различных отделов кишечника больных рыб, а также

образцов воды из прудов:

Бактерии *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundi*, *Citobacter braakii*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Stafilococcus aureus*, *Proteus hauseri*, *Aeromonas veronii* и гриб *Saprolegnia spp.*

Патогенные клинические штаммы *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli.*

Молочнокислые бактерии *Enterococcus hirae* UzLA 12, *Lactobacillus reuteri* UzLA15, *Bifidobacterium sp.*5, *Bifidobacterium sp.*6, *Bifidobacterium bifidum* 24, *Lactobacillus kuncei* 17, *Lactobacillus plantarum* 7, *Lactobacillus plantarum*18 и споровые бактерии *Bacillus subtilis* UZPT-224, *Bacillus licheniformis* UZPT-223, выделенные ранее из фекалий молодых телят 1-3 месячного возраста.

Антагонистическую способность по отношению к патогенам определяли согласно широко используемому в микробиологии методу перпендикулярных штрихов (48), на поверхности агаровой среды в чашке Петри высевали штрихом экспоненциальную культуру исследуемого штамма и инкубировали при оптимальной для него температуре (37°C) в анаэростате в течение 72 часов для образования и диффузии в агар ингибиторных соединений. Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей пробиотической культуры подсевали штрихом экспоненциальную культуру патогенных штаммов, слегка касаясь штриха пробиотической культуры. Чашку вновь инкубировали, но теперь при условиях (температура и продолжительность), благоприятных для роста испытуемых патогенов (26-28°C). Определение результатов испытания проводили через 24 часа инкубации по величине зон (мм) угнетения роста. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемой пробиотической культуры судили по величине зоны ингибирования тест-штамма на границе со штрихом роста. Чем больше расстояние роста тест-культуры от роста продуцента, тем более она чувствительна к антибиотическому веществу, образуемому изучаемым продуцентом.

Результаты исследований

Одним из наиболее важнейших характеристик при отборе микроорганизмов при создании пробиотических препаратов является антагонистическая способность. Нами была изучена антагонистическая способность выделенных ранее из фекалий молодых здоровых телят бактерий, относящихся к родам *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Bacillus*.Бактерии сохранялись в лиофильно высушенном состоянии.

Антагонистическая активность пробиотических бактерий по отношению к условно- патогенным и патогенным бактериям была различной (таблица 1). Наиболее высокой антагонистической способностью обладали *Lactobacillus reuteri* UzLA15, *Bifidobacterium sp.*5, *Bifidobacterium sp.*6, *Bifidobacterium bifidum* 24. Так, *Lactobacillus reuteri* UzLA15 угнетал рост *Aeromonas veronii*, *Proteus hauseri*, *Proteus*

vulgaris , *Hafnia alvei* с зонами отсутствия роста 17, 12, 11 и 10 мм,соответственно. Культуры *Bifidobacterium sp.*5, *Bifidobacterium sp.*6 максимальное угнетение роста, равное 30 и 34 мм, проявили по отношению к *Stafilococcus aureus*,а к *Proteus vulgaris* 12, 15мм, соответственно. Бактерии, относящиеся к родам *Bifidobacterium* и *Bacillus*, не подавляли микроорганизмы *Aeromonas veronii*, *Proteus hauseri*. Однако, антагонистическую активность к указанным культурам проявили все испытанные бактерии рода *Lactobacillus*, зона отсутствия роста патогена колебалась от 3,0 до17 мм. *Bacillus subtilis* UZPT-224, *Bacillus licheniformis* UZPT-223 проявили антагонизм только по отношению к *Hafnia alvei* с зоной ингибирования роста 28,0 и 26,0 мм.

Таблица 1. Антагонистическая активность пробиотических культур к патогенам, выделенным из больных рыб (зона отсутствия роста, мм).

	Пробиотические микроорганизмы (Диаметр зоны подавления роста патогена, мм)									
Условно-патогенные штаммы, выделенные из больных рыб	*Enterococcus hirae UzLA 12*	*Lactobacillus reuteri UzLA15*	*Bifidobacterium sp.5*	*Bifidobacterium sp.6*	*Bifidobacterium bifidum 24*	*Bacillus subtilis* UZPT-224	*Bacillus licheniformis UZPT-223*	*Lactobacillus kuncei 17*	*Lactobacillus plantarum 7*	*Lactobacillus plantarum18*
Hafnia alvei	8,0	10,0	12,0	9,0	6,0	28,0	26,0	6,0	12,0	7,0
Citrobacter freundi	5,0	5,0	6,0	6,0	14,0	0	0	8,0	5,0	0
Citobacter braakii	4,0	4,0	10,0	11,0	5,0	0	0	3,0	0	0
Proteus vulgaris	4,0	11,0	12,0	15,0	8,0	0	0	8,0	6,0	4,0
Morganella morganii	0	4,0	6,0	7,0	4,0	0	0	5,0	4,0	0
Stafilococcus aureus	0	0	30,0	34,0	20,0	2,0	0	2,0	0	0
Aeromonas veronii	9,0	17,0	0	2,0	0	0	0	6,0	8,0	6,0
Proteus hauseri	7,0	12,0	0	0	0	0	0	15,0	6,0	3,0
Saprolegnia spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Необходимо отметить, что ни одна из испытанных пробиотических культур не подавляла рост гриба *Saprolegnia spp.* Возможно этот гриб был очень агрессивным, о чем свидетельствуют проведенные результаты.

Так как рыбы это продукт используемый в питании человека, нам было интересно проверить пробиотические микроорганизмы по отношению к

клиническим штаммам патогенов, выделенным от больных людей.

В таблице 2 приведены результаты по изучению антагонистической способности пробиотических микроорганизмов по отношению к клиническим патогенам; *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Таблица 2. Антагонистическая активность пробиотических культур по отношению к клиническим патогенам.

	Пробиотические микроорганизмы (диаметр зоны подавления роста клинических тест-культур, мм)									
Клинические штаммы	*Enterococcus hirae UzLA 12*	*Lactobacillus reuteri UzLA15*	*Bifidobacterium sp.5*	*Bifidobacterium sp.6*	*Bifidobacterium bifidum 24*	*Bacillus subtilis* UZPT-224	*Bacillus licheniformis UZPT-223*	*Lactobacillus kuncei 17*	*Lactobacillus plantarum 7*	*Lactobacillus plantarum18*
Salmonella typhimurium	14,6	13,4	12,2	10,6	12,6	12,6	12,6	10,6	4,0	12,6
St. aureus	29,3	23,3	22,0	20,0	10,0	4,0	16,0	9,0	5,0	23,0
Ps. aeruginosa	20,3	18,3	18,0	20,0	10,0	1,0	2,0	18,0	16,0	20,0
Enterobacter cloacae	25,3	19,2	14,0	10,0	4,0	3,0	2,0	3,0	7,0	16,0
Proteus mirabilis	20,3	16,3	9,0	17,0	6,0	0	3,0	4,0	8,0	15,0
E. coli	16,3	15,3	15,0	10,0	3,0	2,0	0	2,0	6,0	11,0
Candida albicans	2,0	0	10,0	7,0	2,0	34,0	32,0	3,0	0	2,0

Согласно полученным данным, местный штамм *Enterococcus hirae* UzLA 12 подавлял рост Salm. *typhimurium*, *S. aureus*, Ps. aeruginosa, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, зона задержки роста патогенов колебалась от 14,6 мм до 29,3 и очень слабо подавлял *Candida albicans*, наибольшую антагонистическую активность *Lactobacillus reuteri* UzLA15 проявил по отношению к *S. aureus* зона угнетения - 23,3, E. *cloacae* - 19,2, Ps. aeruginosa 18,3 мм, антагонистическая активность *Lactobacillus kuncei* 17, *Lactobacillus*

plantarum 7, *Lactobacillus plantarum* 18 была значительно ниже.

Bifidobacterum *sp.*5 и *Bifidobacterium sp.* 6 были наиболее активны по отношению к S. aureus и Ps. aeruginosa. При этом, оба штамма подавляли рост *Candida albicans* с зонами угнетения 10,0 и 7,0 мм, соответственно.

Определение антагонистической активности местных штаммов *Bacillus subtilis* UZPT-224, *Bacillus licheniformis* UZPT-223 показало, что обе культуры задерживали рост *Candida albicans* с максимальной зоной отсутствия роста патогена равной 34,0 и 32,0 мм.

Таким образом, проведенные исследования показали, три физиологические группы пробиотических бактерий: лактобактерии, бифидобактерии и споровые, обладают в различной степени антагонистической активностью к условно-патогенным культурам, выделенным из рыб, а также к клиническим патогенным штаммам. После выполнения дополнительных исследований по изучению пробиотических свойств отобранных антагонистически активных штаммов можно будет в перспективе использовать при создании пробиотиков.

Список литературы

1. Усов М.М., Усова О.В., Радько М.М. Ресурсосберегающие технологии – залог успеха рыбной отрасли республики Беларусь / Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Материалы X1V Международной научно-практической конференции, посвященной образованию кафедры кормления сельскохозяйственных животных, физиологии, биотехнологии и ветеринарии к 15-летию кафедры ихтиологии и рыбоводства. / УЩ «БГСХА» 2011. с. 181-185.

2. Чесалин В.А. Сборник научно-технологической и методической документацию. / Труды Белорусского отделения Всесоюзного НИИ озерного и речного рыбного хозяйства (ВНИОРХ), 2011, т.1 Минск -С.3-5.

3. Kent M L, Harper C, Wolf J C. Documented and potential research impacts of subclinical diseases in zebrafish. ILAR journal. 2012; 53(2):126–34. pmid:23382344).

4. Паршуков А.Н. Микробиоценоз радужной форели в садковых хозяйствах Карелии.диссер. к.б.н., Петрозаводск, 2011, 182с.

5. Dhanapala, Pavithra M; Kalupahana, Ruwani S; Kalupahana, Anil W; et al. Characterization and Antimicrobial Resistance of Environmental and Clinical *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Ornamental Fish and Associated Farming Environment in Sri Lanka / Microorganisms; Basel, vol.9, № 10, 2021. 2106. DOI:10.3390/microorganisms 910210.

6. Van Doan H, Hoseinifar SH, Khanongnuch C, et al. Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (Oreochromis niloticus). / Aquaculture.

2018;491:94–100. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.03.019.

7. Кудряшева А.А., Рассказов А.В., Вербицкая И.И., Оникиенко Е.В. Новые натуральные безопасные корма для выращивания рыбы. / Пищевая промышленность. Рыбное хозяйство. Аквакультура. 2011.

8. Кононенко С.И., Юрина Н.А., Данилова А.А. Рыбоводное обоснование применения кормовых пробиотиков. / XI Национальная научно-практическая конференция. Состояние и пути развития аквакультуры в Российской федерации в свете импортзамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны, Санкт-Петербург, 13-15 сент. 2017 г с.56-62.

9. Скурат В.А., Сиволоцкая В.Л., Дегтярин С.М., Говор Г.А., Гребнева Е.И. Пробиотики препараты для профилактики бактериальных заболеваний рыб. / Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре. Тез. Научно практической конф. – М., 2000, -с.114.

10. Soccol C, Porto L, Rigon M. The potential of probiotics: a review. / Food Technology and Biotechnology.2010;48(4):413–434

11. Clements K.D. Fermentation and gastrointenstinal microorganisms in fishes. / Gastrointenstinal microbiology. – London and New York:New York, 1997.-V1/-P156-198

12. Cahill M.M. Bacterial flora of fishes: a review. / Microbiol.Ecology.-Vol.19.-№1,-1990.P 21-41.

13. Ушакова Н.А., Некрасов З.В., Правдин В.Г., Кравцова Л.З., Бобровская О.И., Павлов Д.С. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения. / Фундаментальные исследования. 2012. №1-1.С.184-192.

ВНЕДРЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СРЕДЫ ДТМ-ЭКСПЕРТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ДЕРМАТОФИТОЗОВ В ВЕТЕРИНАРНУЮ И МЕДИЦИНСКУЮ ПРАКТИКУ

Овчинников Р.С., Савинов В.А.
ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва

Дерматофитозы – наиболее распространенные грибковые инфекции как среди людей, так и среди домашних животных. Диагностика дерматофитозов вызывает затруднения как в медицине, так и ветеринарии. Результаты диагностики напрямую зависят от выбора метода исследования, оснащенности лаборатории или клиники, и, главное, от квалификации персонала. Доступные средства экспресс-диагностики дерматофитозов, такие как тест с лампой Вуда, микроскопия в КОН

обладают низкой чувствительностью и специфичностью, часто дают ложно-положительные и ложно-отрицательные результаты.

Микологический посев считается «золотым стандартом» диагностики дерматофитозов, но проведение такого исследования возможно только в условиях лаборатории и занимает много времени. В связи с этим существует потребность в более быстром и доступном способе диагностики дерматофитозов.

В современных условиях высоко востребованы внелабораторные средства диагностики формата «point-of-care testing», позволяющие провести исследование самостоятельно и максимально оперативно, не прибегая к услугам специализированных лабораторий. Применительно к дерматофитозам, таким средством является среда DTM (dermatophyte test medium), которая была разработана D. Taplin et al. для диагностики дерматофитозов человека в полевых условиях. Выявление дерматофитов основано на изменении pH — при росте они поглощают белки и выделяют щелочные метаболиты, а pH-индикатор изменяет цвет среды с желтого на красный. Таким образом, диагностика дерматофитозов становится простой, наглядной и доступной.

За рубежом среда DTM широко вошла в медицинскую практику, значительно облегчив диагностику дерматофитозов. Вслед за медициной среды типа DTM стали широко использовать и в ветеринарии. На сегодняшний день существует ряд зарубежных компаний, выпускающих готовые к использованию DTM-среды под разными коммерческими наименования. Несмотря на достоинства импортных DTM-сред, они имеют существенные недостатки — в первую очередь высокую цену, составляющую примерно 5–6 долл. за один флакон. Кроме того, многие зарубежные диагностикумы, в т.ч. DTM-среды, ушли с российского рынка. Приведенные факты говорят о том, что существует потребность в разработке отечественной питательной среды для экспресс-диагностики дерматофитозов, которая бы учитывала недостатки зарубежных аналогов, была бы недорогой и доступной.

В связи с этим в лаборатории микологии ФНЦ ВИЭВ РАН была начата работа по созданию российской среды, которая получила название «ДТМ-Эксперт». Формуляция среды была значительно переработана по сравнению с классической прописью Taplin et al. Работа по созданию среды включала оптимизацию углеводного состава, изучение влияния различных факторов (белковых, аминокислотных, витаминных, полисахаридных) на ростовые и индикаторные свойства питательной среды; подбор селективных добавок для ингибирования роста бактерий и плесневых грибов, подбор индикатора и ростовых добавок, сравнительное изучение свойств компонентов различных производителей. С точки

зрения импортозамещения, при создании были использованы в основном компоненты российского производства. Проведенные работы позволили добиться хороших ростовых характеристик, а также индикаторных и селективных свойств новой среды [1]. В результате была разработана первая российская дифференциально-диагностическая среда для диагностики дерматофитозов ДТМ-Эксперт, что отражено в патенте RU 2 745 159 C1 «Селективная питательная среда для выделения возбудителей дерматофитозов» (приоритет от 9.04.2020).

Было проведено сравнение диагностической эффективности нескольких методов – посев на среду Сабуро, на ДТМ-Эксперт, тест с лампой Вуда, люминесцентная микроскопия с калькофлуором, микроскопия с КОН. При посеве 54 ветеринарных образцов на ДТМ-Эксперт удалось выделить 16 дерматофитов (100%). Микроскопия с калькофлуором выявила возбудитель в 15 случаях, что составило 93,8%. На среде Сабуро выросло 13 культур (81,3%) дерматофитов. В тесте с лампой Вуда удалось выявить 62,5% положительных образцов, методом прямой микроскопии в КОН - 56,3%. Таким образом, наиболее высокую диагностическую эффективность в исследовании показали два метода: посев на ДТМ-Эксперт и люминесцентная микроскопия с калькофлуором, эффективность этих методов составила 100% и 93,8%. Среда Сабуро была почти на 20% ниже по диагностической эффективности, нежели среда ДТМ-Эксперт [2].

Была изучена диагностическая эффективность среды ДТМ-Эксперт в сравнении с зарубежным аналогом, средой Dermakit (Италия), и со средой Сабуро в качестве контроля. Частота выделения дерматофитов из клинического материала от животных составила 31% для ДТМ-Эксперт, 32% — для Dermakit и 22% для среды Сабуро. Видимый рост дерматофитов появлялся практически одновременно на ДТМ-Эксперт и Dermakit с разницей 1–2 дня. Обычно рост колоний *Microsporum canis* был заметен на этих средах на 6–7 сут. Покраснение среды при росте дерматофитов на ДТМ-Эксперт и Dermakit наступало также практически одновременно — на 8–9 сут. и становилось ярко-выраженным на 10–11 сут.

Активный рост плесневых грибов-контаминантов, препятствующий росту дерматофитов, обнаружен в 27% посевов на среде Сабуро. На среде ДТМ-Эксперт рост плесеней наблюдали лишь в 15% проб, в то время как на импортной Dermakit было контаминировано 23% посевов. Важно отметить, что на среде Dermakit в 13% посевов наблюдали покраснение при росте плесневых грибов, т.е. получали ложноположительный результат, который может приводить к диагностическим ошибкам. На среде ДТМ-Эксперт ложного покраснения, вызванного плесневыми грибами, не наблюдали [3].

Проведенная апробация показала, что российская среда ДТМ-Эксперт по эффективности выделения грибов-дерматофитов не уступает зарубежной среде аналогичного назначения. Более того, на ДТМ-Эксперт не наблюдали ложноположительных реакций при росте плесневых грибов, что выгодно отличает данную среду от зарубежных аналогов. Фасовка отечественной среды во флаконы с широким горлом делает возможным проведение посевов счесов по методу МакКензи, что очень удобно в полевых условиях.

Исследования показали, что на ДТМ-Эксперт растет широкий спектр грибов-дерматофитов, в т.ч. видов, ранее не встречавшихся на территории РФ. Так, от больных дерматофитозом животных-компаньонов впервые в РФ были выделены виды *Nannizzia persicolor*, *Trichophyton benhamiae*, *Nannizzia fulva* и *Microsporum ferrugineum* [4]. Среда ДТМ-Эксперт позволяет выделять кератинофильные грибы не только от млекопитающих, но и от рептилий. Так, от импортированных змей впервые был выделен опасный возбудитель *Ophidiomyces ophidiicola* [5].

Начиная с 2019 г, среда ДТМ-Эксперт активно внедряется в диагностическую практику ветеринарных учреждений. Среда была с успехом апробирована в крупных лабораториях и ветеринарных клиниках московского региона, таких как клинико-диагностическая лаборатория «Неовет», ООО «Ветлаб», СВК «Свой доктор», ветеринарный референс-цент ИВЦ МВА, а также в ветеринарных клиниках городов Рязань, Пермь, Сыктывкар, Екатеринбург, Калининград, Самара, Сортавала, Санкт-Петербург и т.д.

Применение среды ДТМ-Эксперт возможно не только в ветеринарии, но и медицине, т.к. изначально среда DTM разрабатывалась именно для медицины, и за рубежом она используется в основном в медицинских учреждениях. В нашей стране применение DTM-сред получило распространение именно в ветеринарии, в то время как в медицине эти среды практически не используются.

Учитывая положительный ветеринарный опыт, была проведена апробация среды ДТМ-Эксперт в медицинской диагностической практике, на базе двух кожно-венерологических диспансеров: БУЗ УР «Республиканский кожно-венерологический диспансер МЗ УР», г. Ижевск (далее – КВД-1), и Набережночелнинский кожно-венерологический диспансер, г. Набережные Челны (далее – КВД-2). В качестве среды сравнения в обоих КВД использовали агар Сабуро (HiMedia, Индия). В КВД-1 при микологическом посеве на среду ДТМ-Эксперт грибы-дерматофиты были выделены в 9 из 20 случаев (45%). При этом на среде Сабуро дерматофиты выделены только из 6 образцов (30%). Частота выделения дерматофитов на ДТМ-Эксперт была выше на 15%. Рост

колоний *M. canis* на ДТМ-Эксперт обычно фиксировали на 4-6 сут., а покраснение среды наблюдали в среднем на 7,4 сут.

В КВД-2 на среде ДТМ-Эксперт грибы-дерматофиты были выделены в 8 из 20 случаев (40%). При этом на среде Сабуро дерматофиты выделены только из 5 образцов (25%). Частота выделения дерматофитов на ДТМ-Эксперт была выше на 15%, как и в КВД-1. Контаминирующие микроорганизмы на среде ДТМ-Эксперт обнаружены в 2 из 20 посевов, в то время как на среде Сабуро 15 из 20 посевов были контаминированы бактериальной микрофлорой.

Обобщая данные по двум КВД, участвовавшим в исследовании, при посеве 40 образцов материала рост дерматофитов на среде ДТМ-Эксперт получен в 17 случаях (42,5%), а на среде Сабуро – в 11 (27,5%). Таким образом, высеваемость грибов-дерматофитов на ДТМ-Эксперт была на 15% выше. Примечательно, что культуры *T. rubrum* в обеих КВД были получены только на ДТМ-Эксперт, а на среде Сабуро их выделить не удалось. Это свидетельствует о более благоприятных ростовых свойствах опытной среды для прихотливых видов дерматофитов.

Полученные данные позволяют рекомендовать среду ДТМ-Эксперт для внедрения в медицинскую практику. Применение данной среды будет особенно актуально в медицинских учреждениях, не располагающих лабораториями и квалифицированным персоналом, а также для широких скрининговых исследований [6].

Таким образом, разработанная российскими учеными дифференциально-диагностическая среда ДТМ-Эксперт является эффективным средством для внелабораторной диагностики дерматофитозов как в ветеринарии, так и в медицине. Среда не только не уступает зарубежным аналогам, но и по ряду параметров превосходит их, в т.ч. по цене и по доступности в РФ, что играет важную роль в импортозамещении. Опубликованные научные исследования доказали диагностическую эффективность ДТМ-Эксперт как в ветеринарии, так и медицине. Широкое внедрение данной среды позволит расширить диагностический охват, и повысить эффективность диагностики грибковых инфекций в РФ.

Список литературы

1. Savinov V.A., Ovchinnikov R.S., Kapustin A.V. et al. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2019. 315, 022071

2. Савинов В.А., Овчинников Р.С., Лаишевцев А.И. и др. Сравнение основных методов клинической и лабораторной диагностики дерматофитозов // Аграрная наука. 2022. № 6, с. 33-36

3. Савинов В.А., Овчинников Р.С., Капустин А.В., Гайнулина А.А. Экспресс-диагностика дерматофитозов животных. Аграрная наука // 2019. № 10, С. 20-24

4. Савинов В.А., Овчинников Р.С., Южаков А.Г. и др. Новые виды возбудителей в этиологии дерматофитозов животных-компаньонов в московском регионе // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2021. №9, с. 15-25

5. Ovchinnikov R.S., Vasilyev D.B., Gaynullina A.G. et al. Detection of *Ophidiomyces ophidiicola* in three file snakes (Acrochordus gr*anulatus*) imported from Indonesia to the Moscow Zoo (Russia) // J. Zoo Wildl. Med. 2021. 52(3), P. 1074–1078

6. Овчинников Р.С., Братчикова Е.А., Гареева Н.М., и др. Апробация дифференциально-диагностической среды «ДТМ-Эксперт» для диагностики дерматофитий в условиях кожно-венерологических диспансеров // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2022. №1, стр. 53-58

МИКОТИЧЕСКАЯ КОНТАМИНАЦИЯ КОРМОВ ДЛЯ КУНЬИХ КЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Петрова И.В., Семикрасова А.Н., Жилина К.В.
НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева, Родники

Куньи – самый перспективный объект клеточного пушного звероводства. В условиях клеточного разведения одной из причин снижения продуктивных показателей и падежа зверей является скармливание кормов, обсемененных патогенными грибами [1,2], которые размножаются в кормах и кормовом сырье. Эти грибы загрязняют корма и ухудшают их органолептические свойства, снижают пищевую ценность и приводят к порче кормов, тем самым делая их непригодными для скармливания [3,4, 5, 6, 7]. Клинически у норок и соболей поражение грибами проявляется диареей, снижением аппетита, ухудшением воспроизводительной функции. У зверей снижается устойчивость к инфекционным заболеваниям, качество шкурки заметно ухудшается [8, 9]. В последние годы в звероводческих хозяйствах сильно изменилось кормление пушных зверей, все больше используют растительные корма, в связи с этим существует опасность распространения микозов у куньих клеточного содержания.

Работа выполнена в отделе биотехнологии ФГБНУ НИИПЗК и в звероводческих хозяйствах Российской Федерации.

С целью изучения видового состава грибов в кормах для куньих клеточного содержания были проведены мониторинговые исследования в зверохозяйствах. Для лабораторного исследования по ГОСТ 13496.6-2017 [10] был произведен отбор 120 проб кормов (ячмень, пшеница, овощи, куриные продукты, рыбные продукты, мука мясокостная, кормосмесь) [11]. По результатам микробиологических исследований из 67-ми проб выделены грибы 8-ми видов.

На первом этапе работы было проведено микробиологическое исследование кормов, путем посева на дифференциально-диагностические среды [12]. При исследовании проб ячменя микроскопические грибы рода *Fusarium* выделены в 25,7%, *Aspergillus* – 45,7%, *Mucor* – 51,4%, *Penicillium* – 17,1%, *Candida* – 34,3%, *Rhizopus* – 48,6%. В пробах пшеницы установлено: грибы рода *Fusarium* выделены в 13,3% пробах, *Penicillium* – 20%. В пробах овощей обсемененными грибами рода *Aspergillus* 13,3% проб, *Penicillium* – 20%, *Rhizopus* – 20%. При исследовании проб куриных продуктов зараженными грибами рода *Penicillium* оказалось 20%, *Candida* – 40%. Из проб рыбных продуктов грибы рода *Fusarium* выделены из 20% образцов. В 30% пробах мясокостной муки установлены *Aspergillus*. В пробах кормосмеси грибы рода *Fusarium* оказались в 8,6%, *Aspergillus* –20%, *Mucor* – 11,4%, *Penicillium* – 5,7%, *Candida* – 14,3%, *Rhizopus* – 11,4%.

Общую токсичность кормов определяли тестом на белых мышах (введением экстракта корма в желудок мышам) [13] и установлено, что 51,4% проб исследуемого ячменя обладает общей токсичностью, пшеница и овощи – 20%, куриные продукты – 40%, рыбные продукты – 20%, мясокостная мука – 30%, кормосмесь – 85,7%.

Была проведена постановка кожной аллергопробы пробы на кроликах. По результатам анализа при исследовании проб ячменя отрицательный результат в 13 образцах, слабоположительный - в 3, положительный – в 13-ти, резко положительный – в 6-ти пробах. При исследовании пшеницы в 12 пробах отрицательный результат, в 1 – слабоположительный, 2 – положительный. Из 15 образцов овощей 1 проба показала слабоположительный результат, 2 – положительный. При исследовании куриных продуктов все пробы показали отрицательный результат. Из 5 проб рыбных продуктов слабоположительный результат в 1 пробе. Из 10 образцов мясокостной муки 3 пробы оказались положительные. При исследовании кормосмеси 26 проб из 35 показали отрицательный результат, 2 – слабоположительный, 5 – положительный, 2 – резко положительный.

Анализируя полученные данные установлено, что корма, из которых выделены грибы таких родов как: *Fusarium* и *Aspergillus* обладают высокой токсичностью. Пробы кормов, из которых выделены *Mucor*, *Penicillium*,

Rhizopus или *Candida*, являются слаботоксичные, или не обладают токсичностью.

У выделенных в результате исследований чистых культур микроскопических грибов изучали патогенность [14], путем постановки биопробы на белых мышах. В результате анализа установлено, что грибы видов *Fusarium sporotrichioides*, *Asp.flavus* и *Asp. niger* выделеные из проб кормов являются патогенными, *Asp.fumigatus* и *Rhizopus nigricans* – условно-патогенные. 18,2% выделеных культур грибов *Mucor racemosus* являются условно-патогенные, 81,8% патогенные. 26,3% грибов *Candida albicans* явились не патогенные, 31,6% - условно-патогенные, 42,1% - патогенные.

Заключение.

В результате проведенных исследований установлено, что в кормах для куньих клеточного содержания видовой состав микроскопических грибов представлен восемью видами: *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus nigricans*, *Candida albicans*.

Список источников

1. Самсонов А. И. Разработка средств профилактики микотоксикозов норок: дисс. канд. Биол. наук.- Казань, 2009.- 140 с.

2. Овчинников Р.С. // Грибковые инфекции животных. Возбудители. Диагностика. Терапия. – Москва. - 2013. - 100 с.

3. Якимова Э.А. Видовой состав и количественное содержание микроскопических грибов в кормах и кормовом сырье для животных // Биотика. - 6(7). – 2015. – с. 3-10.

4. Антипов В.А. Микотоксикозы важная проблема животноводства // Ветеринария. 2007. № 11. С.7-9.

5. Солдатенко Н. А. и др. Микотоксины скрытая опасность в кормах // Современное состояние и перспективы исследований по инфекционной и протозойной патологии животных, рыб и пчёл. М., 2008. С. 356-361.

6. Семёнов, Э.И. Микотоксикозы в АПК: распространение, диагностика, профилактика [Электронный текст] http://soyanews.info/news/mikotoksikozy_v_apk-_rasprostraneniediagnostika-_profilaktika.html

7. Слугин В.С. // Болезни плотоядных пушных зверей и их этиологическая связь с патологией других животных и человека. – Киров: КОГУП «Кировская областная типография», 2004. – 592 с.

8. Майоров А.И. // Болезни пушных зверей. – М.:КолосС, 2011. – с.83-91

9. Дуарте Диаза. Микотоксины и микотоксикозы / Под ред. Дуарте Диаза. – М.: Печатный Город, 2006. – 382 с.

10. ГОСТ 13496.6-2017 Межгосударственный стандарт комбикорма.

Метод выделения микроскопических грибов

11. Слугин В.С. ветеринарно-санитарная экспертиза кормов для пушных зверей. – М.: Агропромиздат, 1986. – 256с.

12. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: «Лань». – 2020. – 592с.

13. ГОСТ 31674—2012 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности

14. Методические рекомендации по проведению микологических исследований патологического материала и кормов. – Изд.: МСХ СССР. – М.:1959 г.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОППОРТУНИСТИЧЕСКОГО ДРОЖЖЕВОГО ГРИБА *AUREOBASIDIUM PULLULANS* У ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

Самылина И.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН, Москва

Спектр видов оппортунистических грибов, способных вызывать микозы животных, постоянно расширяется. В последнее десятилетие наблюдается заметное увеличение случаев микозов, обусловленных нетипичными возбудителями, в том числе дрожжевыми грибами. В основном дрожжевые грибы являются оппортунистическими патогенами или играют роль комменсалов для животных и человека [1,2].

Вероятность развития микотических инфекций во многом определяется состоянием животного и в первую очередь связана с его иммунным статусом. При нарушении работы иммунитета грибы-оппортунисты могут стать причиной микозов и вызвать патологические изменения в организме. Диагностика и терапия в области микологии до сих пор вызывают трудности у практикующих врачей, особенно на фоне изменения этиологической структуры микозов.

Грибы рода *Aureobasidium* – сапротрофы, широко распространены в окружающей среде. Патогенная роль *Aureobasidium spp.* у животных изучена слабо. Вид *A. pullulans* является одним из возбудителей феогифомикозов у мелких домашних животных, может вызывать кератомикоз, легочный микоз с сепсисом, кожные микозы у животных [3,4].

В зарубежной литературе представлен случай описания феогифомикоза у собаки с язвенным поражением правой конечности в послеоперационный период кастрации, вызванный *A. Pullulans* [5].

В отечественной литературе нам не удалось обнаружить сведений о выделении дрожжевых грибов *A. pullulans* от мелких домашних животных. В нашей статье представлены случаи идентификации данного возбудителя у домашних животных в России.

В лаборатории микологии и антибиотиков им. А.Х.Саркисова ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН были проведены микологические исследования образцов, отобранных от домашних животных с подозрением на микозы. Всего было отобрано 1353 проб, в том числе от собак 835, от кошек 423 и 95 образцов от других видов животных (попугаи, крысы, кролики).

Микологический анализ проводился в несколько этапов. Материал был посеян на среду Сабуро с хлорамфениколом (HiMedia, Индия). Инкубирование посевов проводили в аэробных условиях при температуре 26-28°С, срок инкубирования - до 21 суток. Выращивание продолжали до формирования колоний с выраженными культуральными и морфологическими признаками. Идентификацию полученных культур проводили на основании макро- и микроморфологических свойств изолятов в сравнении с референтными данными микологического атласа «Atlas of Clinical Fungi» (S. de Hoog et al. 2020). Молекулярно-генетическую идентификацию выделенных культур грибов проводили методом секвенирования по Сэнгеру. Секвенировали участки внутреннего транскрибируемого спейсера гена рибосомальной РНК (ITS) с праймерами: ITS1Fwfun TTG GTC ATT TAG AGG AAG TAA AAG TC; ITS1Rvfun CTG CGT TCT TCA TCG ATG C. Определение нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США) по инструкции производителя. Выравнивание полученных последовательностей с имеющимися в базе данных GenBank выполняли с использованием пакета программ Standard Nucleotide BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

В результате исследований *A. pullulans* идентифицирован в 36 случаях: 22 у собак (5,1% от общего числа выявленных грибов), 12 у кошек (6,7%), а также 1 случай у домашнего ворона и 1 случай у попугая (в совокупности 4,9% от других видов животных).

Процентное соотношение выделенных грибов *A. pullulans* к общему числу остальных дрожжевых грибов (*Malassezia spp.*, *Candida spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Trichosporon spp.*) было выше у кошек (20,3%).

Более подробная информация о выделенных дрожжевых грибах у животных представлена на рисунке 1.

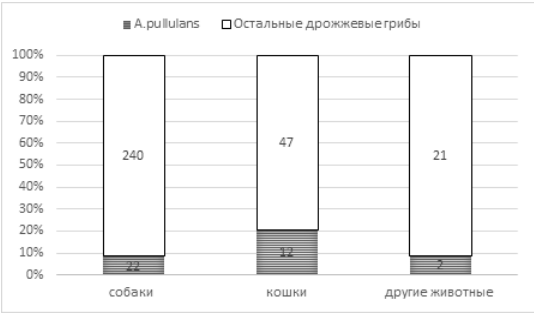


Рис.1. Соотношение выделенных грибов *A. pullulans* и остальных дрожжевых грибов, выделенных у животных.

Типичные колонии *A. Pullulans* формируются в течение 7 суток инкубации. Колонии *A. pullulans* могут иметь разную окраску в процессе роста и меняют цвет от белого до бледно-розового. В старых колониях появляются участки темно-коричневого цвета. Форма колонии звездчатая, с неровными краями. Поверхность кожистая, с матовым блеском.

На ранних стадиях роста колоний при микроскопии наблюдали большое количество дрожжевых клеток или бластоконидий. Затем, по мере формирования колонии образуются гиалиновые, септированные гифы мицелия, а также конидии различной формы: округлой, овальной, элипсовидной. Часто наблюдается почкование бластоконидий.

По мере формирования колонии, гифы могут менять цвет на черновато-коричневый и затем они дифференцируются в темноокрашенные артроспоры и в толстостенные хламидоспоры [6].

На рисунке 2 представлена микроскопическая картина культуры *A. pullulans*, микроскопированная на 7 сутки роста.

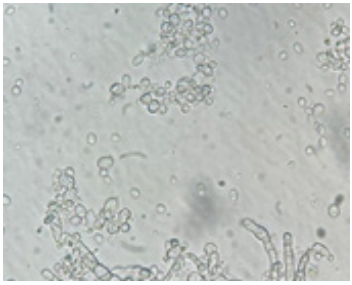


Рис.2. Микроскопия культуры *A. pullulans*, x400.

Для подтверждения фенотипической идентификации было проведено ITS-секвенирование типичного изолята *A. pullulans*, выделенного из уха собаки. BLAST-анализ нуклеотидной последовательности показал 98,98%

гомологичность со штаммами вида *A. pullulans*. Данная последовательность была депонирована в GenBank NCBI под номером OP895176.1.

Основным локусом выделения *A. pullulans* являлся пораженный кожный покров животных, в том числе с признаками аллергии. Но также этот вид был выделен у кошек из-под когтей, из мочи, а у собак из носового похода, ректального смыва и слухового канала. У попугая *A. pullulans* был выделен из помета.

В отечественной и зарубежной литературе крайне мало данных о частоте встречаемости дрожжевых грибов рода *Aureobasidium* у животных-компаньонов. Их клиническая роль часто остается недооцененной из-за отсутствия квалифицированного микологического обследования и трудностей идентификации этих грибов.

В данном исследовании впервые удалось идентифицировать оппортунистический патоген *A. pullulans*, который ранее у домашних животных на территории РФ, судя по доступным источникам, не регистрировался. Это прямо свидетельствует о расширении видового состава оппортунистических патогенов. В целом клиническая роль *Aureobasidium spp.* в патологиях животных требует дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Багирова Н. С. Место *Aureobasidium pullulans* среди возбудителей оппортунистических инфекций человека (обзор литературы). Лабораторная служба. 2018; 7 (2):12-18.

2. Liu D, Ma L, Shi Y et al. Molecular diagnosis and source tracing of an infection of *Aureobasidium pullulans*. J Infect Dev Ctries. 2019 Dec 31;13(12):1174-1179.

3. Yamamoto S, Ikeda M, Ohama Y et al. *Aureobasidium* melanigenum catheter-related bloodstream infection: a case report. BMC Infect Dis. 2022 Apr 5;22(1):335.

4. Yang G, Wang Y, Fang Y et al. Transcription Factors in *Aureobasidium spp.*: Classification, Regulation and a Newly Built Database. J Fungi (Basel). 2022; 8(10):1096.

5. Waller S, Ferreira M, Gomes A et al. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Aureobasidium pullulans* infection in a dog. Vet Ital. 2021 Jul 27;57(3).

6. Hoog G de., Guarro J, Gen J, et al. Atlas of clinical fungi. 4th ed. 2020. Foundation Atlas of clinical fungi. Hilversum. 1,2: 1599 p.

СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКОЗОВ КОЖИ У ДОМАШНИХ И ДИКИХ ЖИВОТНЫХ В КАЗАХСТАНЕ И ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ РОССИИ

Смагулова А.М[1,2]., Глотова Т.И[2]., Кухар Е.В[1].

[1]Казахский агротехнический исследовательский университет им. С. Сейфуллина, Астана

[2]Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН, Краснообск

Микозами называют обширную группу заболеваний, объединенных одним признаком – все они вызваны патогенными грибками, паразитирующими на коже, слизистых и других тканях животных и человека. Среди всех кожных инфекций микозы занимают первое место по распространенности. Классическим примером грибковых поражений кожи являются дерматомикозы.

Дерматомикозы животных – зоонозные или зооантропонозные контагиозные болезни грибковой этиологии, характеризующиеся поражением кожи и ее производных. Возбудителями болезней являются несовершенные грибы родов *Trichophyton* и *Microsporum*, вызывающие соответственно трихофитию и микроспорию. Они представляют собой группу грибов, приспособившихся в процессе эволюции к паразитированию в кератинизированных тканях человека и животных. Известно около 20 видов дерматофитов, которые могут вызывать заболевание человека и животных [1].

Зоофильные дерматофиты распространены повсеместно. Это паразиты большинства домашних животных (кошек, собак, рогатого скота), являющихся источником заражения людей. Они имеют специфический аффинитет к кератину определенных животных, которые являются для них хозяевами: *M. canis* – собаки, кошки, крупный рогатый скот, овцы, свиньи, мелкие грызуны; *M. distortium* – собаки, кошки, лошади, обезьяны; *M. g*allinae – домашняя птица; *M. nanum* – свиньи; *M. persicolor* – кроты; *T. equinum* – лошади; *T. mentagrophytes* var. *erinacei* – мелкие грызуны, ежи; *T. mentagrophytes* var. *gypseum* – собаки, кошки, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, крысы, обезьяны; *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* – грызуны; *T. verrucosum* – собаки, кошки, крупный рогатый скот, свиньи, лошади [2].

Согласно данным LIFE (Leading International Fungal Education), профилирующейся на возбудителях, грибковых инфекциях, диагностике и лечении, большинство грибковых инфекций вызывается родами *Trichophyton*, *Candida*, *Aspergillus* и *Cryptococcus* [3]. Сообщается о

выявлении в биоматериале с пораженных участков кожи домашних животных различных оппортунистических грибов родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Phoma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Candida* и других представителей плесневых грибов и дрожжей, наряду с классическими возбудителями [4, 5, 6].

От домашних питомцев в разное время выделялись возбудители дерматофитии (микроспория и трихофития), кандидоз и поражения дрожжевым грибком *Malassezia*. Однако, все же основными возбудителями дерматофитии кошек и собак был *M. canis*. При этом частота дерматофитий у кошек вдвое выше [7, 8, 9].

О выделении *M. canis* от диких млекопитающих упоминается достаточно часто [10, 11, 12, 13, 14]. Описаны бессимптомные и клинически выраженные случаи дерматофитоза у нескольких видов диких псовых: дикой лисы [15], рыжей лисы [16], серого волка [17], гривастого волка [18]. Исходя из биологии возбудителя логично, что *Microsporum canis* чаще встречается среди плотоядных животных. Гораздо чаще описываются случаи дерматофитоза у диких кошачьих животных: лев, пума, тигр, оцелот. При этом упоминается о выявлении возбудителя микроспории от диких или цирковых кошачьих животных, таких как тигры, львы, пантеры, ягуары и другие [19, 20, 21, 22].

В период с 2012-2022 год было проанализировано 543 пробы биоматериала домашних и диких животных на выявление возбудителей микозов кожи. При первичном выделении возбудителей из биологического материала только в 17,1% случаев были обнаружены дерматомицеты родов *Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.* Основными возбудителями микозов у домашних животных были оппортунистические плесневых грибы *Mucor spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Chaetomium spp.*, *Eurotium spp.*, *Phoma spp.*, *Trichoderma spp.*, *Lecanicillium psalliotae*, *Scopulariopsis brevicaulis*. Они выявлены в 50,2% случаев. Всего в 5,1% случаев выделения были дрожжи. Нами идентифицированы дрожжи родов *Candida spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Exophiala spp.* В 27,6% случаев в пробах биоматериала рост микромицетов отсутствовал либо наблюдался бактериальный рост [23].

Анализ полученных результатов указывает, что спектр возбудителей дерматомикозов, как у домашних, так и у диких животных, обитающих в зоне северного Казахстана и в Западно-Сибирском регионе России, резко изменился. При этом отмечается сдвиг выявления в сторону увеличения числа оппортунистических возбудителей. Так, из общего числа идентифицированных микромицетов классические возбудители микроспории и трихофитии выявлялись в 23,6%, возбудители оппортунистических плесневых микозов выявлены в 69,3%, условно патогенные дрожжи – в 7% случаев.

Таким образом, нами достоверно подтверждено изменение спектра возбудителей микозов кожи у домашних и диких животных в зоне северного Казахстана и в Западно-Сибирском регионе России, что подтверждает публикации других ученых.

Список литературы

1 Яковлев А.Б. Микроспория. Трихофития. Фавус. М.: Новик, 2013. С 135.

2 Wael F. El-Tras1, Ahmed A. Tayel2, Radi A. Mohamed3, Doaa M. El-Kordy4, Nevein N. El-Kady5, Ahmed Samir6. Mixed rearing correlates with the existence of *Trichophyton verrucosum* pathogens in humans // Dermatologica sinica. – Том: 33., Вып. 3. – С. 130-133. Опубл.: SEP 2015. http://dx.doi.org/10.1016/j.dsi.2014.12.006

3 Боровкова К.Е., Макарова М.Н. , Никифорова Л.Р., Салмова Ю.В. Модели грибковых инфекций на животных. Лабораторные животные для научных исследований. 2021; 3. https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-03-05.

4 Овчинников Р.С., Маноян М.Г., Панин А.Н. Эмерджентные грибковые инфекции животных: новые виды возбудителей // VetPharma. 2014. №2 (18). URL: https://cyberleninka.ru/article/n/emerdzhentnye-gribkovye-infektsii-zhivotnyh-novye-vidy-vozbuditeley (дата обращения: 09.03.2021)

5 Кухар Е.В., Курманов Б.А., Киян В.С., Егорчева Е.В., Муранец А.П., Шарипова А.М., Панченко Н.А., Никулина А.И. Изменение традиционного спектра возбудителей трихофитии крупного рогатого скота в Казахстане // Роль ветеринарной науки и практики в эффективном развитии животноводства: матер. межд. научно-практич. конференции. – Алматы, 2012. – С. 333-340.

6 Bennett A, Ponder MM, Garcia-Diaz J (2018) *Phoma* Infections: Classification, Potential Food Sources, and Its Clinical Impact // Microorganisms. 6(3):58.

7 Глотова Т.И., Глотов А.Г. Особенности распространения дерматомикозов у мелких домашних животных и современные тенденции их лечения и диагностики // Материалы международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения-10: «Новые перспективы подготовки конкурентоспособных кадров и роль науки в формировании индустриально-инновационной политики страны», посвященной 120-летию со дня рождения С. Сейфуллина. – 2014. – Т.1., ч.1. – С.96-97.

8 Nweze E.I. Dermatophytoses in domesticated animals. Rev. Inst. Med. Trop. 2011;53(2):95–99.

9 Mihaylov G., Petrov V. & Zhelev G. 2008. Comparative investigation on several protocols for treatment of dermatophytoses in pets. Trakia Journal of

Sciences. 6(1): 102-105.

10 Carman, M.G. et al. Dermatophites isolated from domestic and feral animal. // N.Z. Vet. J., 27:136, 1979.

11 Costa, E.O. Etiologia microbiol gica de dermatomicoses em animais dom sticos, ex ticos e homem // In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterin ria, 22, Curitiba, 1992. Anais. P. 566.

12 Costa E.O., Diniz L.S.M., Carvalho V.M., Coutinho S. & Benites N.R. 1995. Dermatoses observed in man, laboratory, domestic and wild animals, in Sao Paulo, Brazil. Restrospective study. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterin ria e Zootecnia. 47(4): 601-607.

13 Figueiredo M.A.P., Manrique W.G., Belo M.A.A. & Reis H.R.C. 2014. Zoonotic potential of health wild felids for dermatophytes. Journal of Animal and Veterinary Advances. 13: 1018-1021.

14 Costa, E.O. & Diniz, L.S.M. & Benites, Nilson & Coutinho, Selene & Carvalho, Vania & Dutra, L.F. & Serra, E.G.. (1994). Human and animal dermatomycosis: outbreaks of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum. R*evista de Sa de P blica. 28. 337-340.

15 Fischman O., Siqueira P.A. & Baptista G. 1987. *Microsporum gypseum* infection in a gray wolf (*Canis* lupus) and a camel (Camelus bactrianus) in a zoological garden. Mycoses. 30(7): 295-297

16 Knudtson W., Gates C., Ruth G. & Hadley L.D. 1980. *Trichophyton mentagrophytes* dermatophyosis in wild fox. Journal of Wildlife Diseases. 16(4): 465-468.

17 Malmasi A., Khosravi A.R., Selk Ghaffari M. & Shojaee Tabrizi A. 2009. *Microsporum canis* infection in a red fox (Vulpes vulpes). Iranian Journal of Veterinary Research. 10(2): 189-191.

18 K.H.N.P. Pereira, E.L.R. Oliveira, R.A.B. Gon alves, et al. 2018. Dermatophytosis Caused by *Microsporum canis* in a Free-Living Maned Wolf (Chrysocyon brachyurus) // Acta Scientiae Veterinariae. 46(Suppl 1): 262.

19 Bentubo H.D.L., Fedullo J.D., Corr a S.H.R., Teixeira R.H.F. & Coutinho S.D. 2006. Isolation of *Microsporum gypseum* from the haircoat of health wild felids kept in captivity in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 37(2): 148-152.

20 Sykes J.M. & Ramsay E.C. 2007. Attempted treatment of tigers (Panthera tigris) infected with *Microsporum canis*. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 38(2): 252-257.

21 Takatori K., Ichijo S. & Kurata H. 1981. Dermatophytosis of tiger caused by *Microsporum canis*. Mycopathologia. 73(2): 105-108.

22 Y. Kukhar, A. Smagulova, V. Kiyan. Generalized Dermatophytosis of Combined Etiology in a Circus Tiger (Panthera Tigris Altaica) // International Journal of Veterinary Science, 2022, 11(4): 552-556. https://doi.org/10.47278/journal.ijvs/2022.159

23 Е.В. Кухар. (2014) Отчет о научно-исследовательской работе № гос. регистрации 0112РК01358 «Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматофитий и создание тест-систем для диагностики микроспории, руброфитии и гипсовой трихофитии» (заключительный).– Астана, С. 32-42.

Глава 11

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ МИКОЛОГИИ

DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.11

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA* ПОСЛЕ ДОЛГИХ ЛЕТ ХРАНЕНИЯ

Бекмухамедова Н.К., Мамиев М.С.
Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан

Введение

В последнее время имеется значительное количество публикаций, посвященных изучению сохранности свойств микроорганизмов при хранении различными методами. Традиционные методы хранения, такие как периодические пересевы, хранение под минеральным маслом, под водой, в почве являются доступными по цене и не очень затруднительны по исполнению в лабораторных условиях. Современные методы, такие как лиофилизация и криоконсервация, обеспечивают длительное сохранение не только жизнеспособности, но и генетической стабильности образцов. Они активно используются практически во всех крупных национальных коллекциях культур, а также во многих промышленных коллекциях предприятий и научных учреждений [1,2,3,4,5].

В работах Похиленко В.Д. и др. [6] представлен критический обзор методов хранения микроорганизмов, практикуемых в международных, национальных, региональных, институтских и университетских коллекциях живых культур. Описаны факторы, значимые на этапе подготовки, выбранных для консервации микробных культур и влияющие на исход их хранения. Рассмотрены пути совершенствования методов хранения микроорганизмов, которые могут быть полезными в практической работе.

В настоящее время 80% штаммов мицелиальных грибов заложено на хранение методом лиофильного высушивания. Выборочные проверки продемонстрировали сохранение жизнеспособности после 35 лет хранения, в частности, у представителей видов *Rhizopus oryzae*, *Melanocarpus albomyces*, *Penicillium variabile*, *Clonostachys rosea F. catenulata*, *Thielavia terricola*, *Trichoderma viride* и др. Криоконсервация проводится в защитных средах с оптимальной для каждой культуры скоростью охлаждения [7].

После предварительных исследований была лиофилизирована вся коллекция микроорганизмов при использовании в качестве защитной среды «желатин+сахароза». Хранение микроорганизмов в лиофилизированном состоянии для больших коллекций очень экономично. Проверка физиолого-биохимических свойств микроорганизмов после лиофилизации показало, что их свойства не изменялись [8].

В работах отечественных и зарубежных авторов приводятся данные о различной устойчивости микроорганизмов при консервации. Жизнеспособность клеток является важным показателем, при

использовании различных способов поддержания и сохранения микроорганизмов, которая оценивается в процентах по отношению к контролю [9,10,11,12].

Авторами [13] описаны и установлены сроки хранения культур микроорганизмов при лиофильно-высушенном состоянии спустя 50 лет при температуре +4°С. По данным авторов, количество живых клеток в ампуле все еще составляет 106-109, достаточное для поддержания культур. За этот период происходило постепенное снижение количества жизнеспособных клеток про- и эукариотов.

После 33 лет хранения в лиофилизированном состоянии сохранили жизнеспособность 14 штаммов грибов: рода *Aspergillus niger* (4 штамма), *Aspergillus fumigates* (3штамма), *Aspergillus ochraceus* (3 штамма), *Aspergillus oryzae* (1 штамм), *Fusarium sp.* (2 штамма), *Citromyces glaber* (1 штамм). Погиб штамм *Alternaria sp.* 413 [14].

Целью настоящего исследования является изучение влияния различных методов хранения на жизнеспособность мицелиальных грибов и сохранности физиологической активности.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили микроскопические грибы коллекционного фонда *Trichoderma viride* 445 и *Trichoderma harzianum* 846, выделенный сохраняемые в коллекции микроорганизмов Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан течение длительного времени.

Метод хранения микроорганизмов в стерильной почве и песке. Для закладки культур микроскопических грибов на хранение почву и песок тщательно просеивали через мелкое сито, рассыпали на эпиндорфики по 3 г и в течение 3 дней стерилизовали по 30 минут под давлением в 1,5 атм. в автоклаве. Мицелий со спорами, выросший на косом агаре Чапека, г/л: NaNO3 - 2; KH2PO4 - 1; MgSO4 - 0,5; KCl - 0,5; FeSO4 - следы, сахароза - 20, вода водопроводная - 1 л; pH 6,8-7,0. Культуры выращивали в течении 7 суток, при температуре 27 оС. снимали петлей и в несколько приемов переносили в пробирки со стерильной почвой. Затем ватные пробки обрезали вровень с пробиркой и заливали парафином. В таком виде пробирки, завернутые в бумагу, хранили в закрытых шкафах при +30 и +4оС. Для получения свежей агаровой культуры, и проверки жизнеспособности грибов почву в пробирке встряхивали и стерильно пересыпали в пробирки с агаризованной средой Чапека в таком количестве, чтобы вся поверхность агара покрылась крупинками почвы. Пробирки с почвой помещали в термостат при 270 не менее чем на 7 дней, штаммы грибов, не давших роста на агаре, считали не сохранившими

свою всхожесть. Отдельно отбирали пробирки с выросшим на агаре мицелием [6].

Для лиофильного высушивания использовали 7-суточные микроскопические грибы, выращенные на агаризованных элективных средах. их смывали защитной средой, состоящей из обезжиренного молока, 1,5% желатины, крахмала (для микроскопических грибов и актиномицетов) тщательно встряхивали. Полученную суспензию каждой культуры разливали в пенициллиновые флаконы по 5 мл. Лиофилизацию культур осуществляли на установках «ALPHA 1-2 LDplus» и ТГ-50 с предварительным пристеночным замораживанием. После высушивания крышки бутылочек герметически укупоривали алюминиевыми колпачками или парафином [6]. Выживаемость культур изучали до лиофильного высушивания, после него и в процессе хранения. Жизнеспособность оценивали в процентах по отношению к контролю.

Антагонистическую активность микроскопических грибов изучали методом агаровых блоков [15]. В качестве тест культуры использовали фитопатоген *Verticillium dahliae*, возбудитель вертицеллезного вилта растений.

Результаты

В коллекции промышленно-важных культур микроорганизмов Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан в течение долгих лет хранятся около 1000 штаммов промышленно-важных микроскопических грибов различных родов, являющиеся активными антагонистами, ростстимуляторами, экстремофилами и тд.

Проведены исследования по сохранности жизнеспособности и морфологической, физиологической особенности микроскопических грибов, активных антагонистов и ростстимуляторов растений рода *Trichoderma viride* 445, *Trichoderma harzianum* 846 - (табл.1).

Таблица 1. Коллекционные штаммы микромицетов.

Дата выделения	Название	Источник выделения	Биотехнологический потенциал
2005	*Trichoderma viride* 445	Получен из Института генетики АН РУз	Активный антагонист к фитопатогенам, ростстимулятор растений
1980	*Trichoderma harzianum* 846	Ризосфера растений Ташкентская обл.	

В 2013 году микроскопических грибов рода *Trichoderma viride* 445, *Trichoderma harzianum* 846, хранившихся методом периодических пересевов, переводили на другие способы хранения - на стерильный

песок, почву и на метод лиофилизации.

В процессе десятилетнего хранения культур микроскопических грибов *Trichoderma viride* 445, *Trichoderma harzianum* 846 проверяли на жизнеспособность. Результаты показали, что культуры активно сохраняют жизнеспособность при таких условиях хранения (табл.2, рис. 2).

Таблица 2. Жизнеспособность промышленно-важных культур микромицетов при хранении в стерильном песке и почве.

Микромицеты	*Trichoderma viride 445*	*Trichoderma harzianum 846*
	Титр клеток, КОЕ/мл	
Методы хранения	Исходный $2,8x10^{10}$	Исходный $2,2x10^{10}$
Стерильный песок	$3x10^{7}$	$4x10^{7}$
Стерильная почва	$2,3x10^{7}$	$1,2x10^{7}$
Лиофильное высушивание	$1,8x10^{8}$	$1,2x10^{8}$

При хранении в стерильном песке через 10 лет количество жизнеспособных клеток *Trichoderma viride* 445 снизился на 3 порядка 3x107. Исследования показали, что количество жизнеспособных клеток *Trichoderma viride* 445 при хранении в стерильной почве течение 10 лет составило 1,9x108.

Также проведены исследования по изучению сохранности морфологических свойств микромицетов на стерильной почве (рис.1).

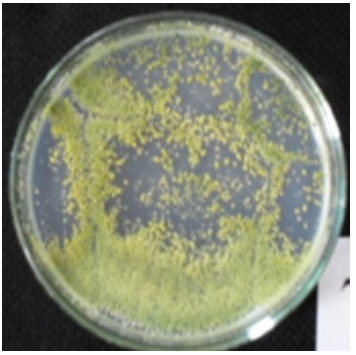
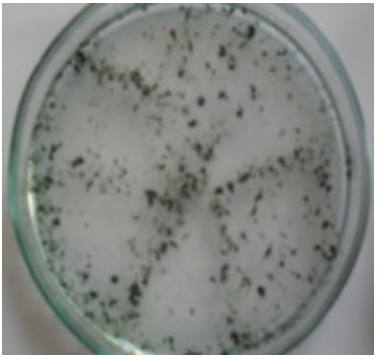
1)  2) 

Рисунок 1. Морфология 1) *Trichoderma harzianum* 445, 2) *Trichoderma harzianum* 846

Полученные данные подтверждают, что *Trichoderma harzianum*

445, *Trichoderma harzianum* 846 с успехом могут хранятся всеми использованными методами, которые являются благоприятными для сохранения и поддержания жизнеспособности.

Установлено, что спорообразующие культуры микроорганизмов хорошо переносят процессы высушивания лиофилизации и сохраняют жизнеспособность и необходимые важные признаки. Результаты показали, что культуры сохраняют выживаемость клеток. При этом количество жизнеспособных клеток у штаммов микромицетов 846, 445 рода *Trichoderma* составлял 1,2x108 и 1,8x108 КОЕ/мл (табл. 3). При этом у изученных штаммов снижение количества жизнеспособных клеток в среднем составляет 2 порядка после хранения.

Таблица 3. Жизнеспособность производственно-важных штаммов грибов при хранении методом лиофилизации.

№	Микроскопические грибы	Титр клеток, КОЕ/мл		
		Исходный	После сушки	Через 10 лет
1	*Trichoderma viride 445*	$3{,}0x10^{10}$	$2{,}8x10^{10}$	$1{,}8x10^{8}$
2	*Trichoderma harzianum 846*	$2{,}9x10^{10}$	$2{,}6x10^{10}$	$1{,}2x10^{8}$

При хранении различными методами микроорганизмов в их клетках происходят некоторые изменения, последствия которых, выявляются в течение культивирования культур в первом пассаже. После хранения выражаются в изменении количества жизнеспособных единиц, ингибировании или стимуляции процессов продукции антибиотиков, ферментов.

С этой целью изучено сохранность антагонистической активности промышленно-важных штаммов микромицетов рода *Trichoderma viride* шт 445, *Trichoderma harzianum* 846 при хранении различными методами через 10 лет (табл. 4, рис.2).

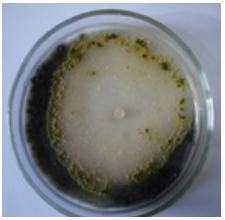


Рисунок 2. Подавление фитопатогена *Verticillium dahliae*.
культурой *Trichoderma viride* 445 после хранении 10 лет методом

лиофильной сушки

Таблица 4. Антагонистическая активность промышленно-важных штаммов микромицетов при хранении различными методами.

Методы хранения	*Trichoderma viride 445*	*Trichoderma harzianum 846*
	Зона угнетения фитопатогена *Verticillium dahliae*, D=мм	
Периодический пересев	65	45
Вазелиновое масло	55	40
Стерильный песок	60	42
Стерильная почва	55	44
Лиофильная сушка	60	45

Таким образом, показано, что стерильная почва и песок, а также метод лиофилизации являются наиболее оптимальными методоми для хранения микроскопических грибов рода *Trichoderma*. Показано, что промышленно-важных микроскопические грибы при хранении изученными методами сохраняют жизнеспособность и не теряют антагонистическую активность к *Verticillium dahliae*.

Выявления сохранности и изменчивости морфолого-культуральных, физиологических, биохимических показателей, высокой жизнеспособности микроорганизмов - продуцентов биологически активных соединений, являются практически важными показателями для рекомендации их теоретического, практического применения, использования в научных исследованиях, отраслях сельского хозяйства, промышленности, медицине и разработках новых биодобавок, биопрепаратов, что является гарантом.

Список литературы

1. Janda J.M., Abbot S.L. Bacterial identification for publication: when is enough enough. J ClinMicrobiol 40(6): 1887-1891, 2002.
2. Versalovic J. Manual of Clinical Microbiology 10th Edition. American Society for Microbiology, Washington D.C., 2011.
3. B.D Diagnositcs. Manual of Microbiological Culture Media Second Edition. Copyright by Becton Dickinson and Company, Sparks, Maryland, 2009.
4. Donev, T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms / T. Donev.-Sofia, 2001.-93p.

5. Esteves-Ferreira, A.A., Corr a, D.M., Carneiro, A.P.S. *e*t al. Comparative evaluation of different preservation methods for cyanobacterial strains J ApplPhycol (2013) 25: 919. doi:10.1007/s10811-012-9927-9
6. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. 2009. № 4. С. 99-121.
7. Иванушкина Н. Е., Кочкина Г. А., Еремина С. С., Озерская С. М. Опыт использования современных методов длительного хранения грибов во всероссийской коллекции микроорганизмов // Микология и фитопатология. 2010. Том 44. № 1. С.19-30.
8. Perry S.F. Freeze-drying and cryopreservation of bacte¬ria //Mol. Biotech. 1998. V.9. №1. P.59-64.
9. Сидякина Т.М. // Методы консервации микроорганизмов. Пущино. 1988.
10. Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. //Сб. научн. трудов "Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы". АН СССР, Пущинский научн. центр. Инс. Биол. физики. Пущино 1991 с.81-159.
11. Цуцаева А.А., А.Е. Ананьина, Л.М. Балыбердина, Л.В. Степаншк, Н.В. Павленко. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов // Микробиология, 2008, том 77, № 5, с. 696-700.
12. Золотилина Г.Д., Шакирзянова М.Р. Жизнеспособность коллекционного фонда бактерий при длительном хранении // Доклады АН РУз, 2004, №2, С. 84-90.
13. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. //Микробиология 2011. Том 80. № 6. С. 842.
14. Куплетская М.Б., Аркадьева З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии // Микробиология, МГУ.-Москва, 1997.-Т.66.-№2.-С. 283-288.
15. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. // М: Изд. МГУ, 2003. С.104.

ВЛИЯНИЕ ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ ОКСИДОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ЭКЗООКСИДОРЕДУКТАЗ *ASPERGILLUS NIGER*

Блинова Е.О., Аникина Н.А, Смирнов В.Ф., Шишкин А.Ю.
НИНГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Известно, что микроскопические грибы являются активными деструкторами различных строительных промышленных материалов

и изделий из них, используя последние в качестве источника питания, что приводит не только к их химической деградации, но и к изменению их эксплуатационных характеристик. Кроме этого рост и развитие микромицетов на различных материалах существенным образом сказывается на качестве среды обитания человека, т.к. многие виды мицелиальных грибов-деструкторов являются условно-патогенными и способны вызывать заболевания людей: микозы, микоаллергозы и микотоксикозы. Одним из самых распространённых способов защиты материалов от биоповреждений, вызываемых микроскопическими грибами, является использование биоцидных препаратов. Учитывая высокие адаптационные возможности микромицетов, арсенал используемых биоцидных соединений необходимо постоянно пополнять. Весьма перспективными в этом плане являются оксиды тяжелых металлов (ZnO, TiO2, CuO), которые находят широкое применение в качестве антимикробных препаратов, вызывающих гибель микроорганизмов и предотвращающих биоповреждение различных материалов [1]. Особый интерес вызывают мелкодисперсные микро- и наноразмерные частицы оксидов металлов, обладающих фотокаталитической активностью [2]. Наличие фотокаталитической активности позволяет создавать новое поколение биоцидных и дезинфицирующих средств с регулируемым антимикробным эффектом как в плане интенсивности биоцидного действия, так и в плане избирательности по отношению к видам микроорганизмов [3]. Известно, что TiO2, ZnO и другие простые оксиды металлов и их модификации фотокаталитически активны только в УФ-диапазоне или близкой к УФ-области видимого света. УФ-диапазон составляет всего около 5–9% в спектре солнечного света (100–400 нм), при этом распределение интенсивности между этими длинами волн не одинаково и основная часть приходится на 350–400 нм. Соединения, поглощающие свет с длиной волны менее 400 нм, работают под действием солнечного света малоэффективно и требуют отдельный источник излучения на длине волны поглощения. В связи с этим актуальным является поиск новых соединений, которые поглощают свет в видимом диапазоне, т.е. проявляют фотокаталитическую активность.

Целью работы являлось исследование влияния фотокаталитически активных субмикронных частиц оксида вольфрама и сложного оксида RbTe1.5W0.5O6 на активность экзокаталазы и экзопероксидазы гриба *Aspergillus niger* в условиях действия света и в темноте. Объектом исследования являлся активный биодеградант различных промышленных материалов *Aspergillus niger* van Tieghen ВКМF-1119, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов. В качестве оксидов тяжелых металлов были использованы оксид вольфрама (III) (WO3) со средним размером

частиц ~ 670 нм и синтезированный в НИИ Химии ННГУ сложный оксид RbTe1.5W0.5O6 в виде субмикронных частиц диаметром 736 нм. Источник света – светодиодные прожекторы JAZZWAY PFL-C3 мощностью 50 Вт (плотность потока излучения 524 Вт/м2).

Предварительно для проведения эксперимента осуществляли выращивание мицелия гриба в колбе Эрленмейера с жидкой питательной средой Чапека-Докса без добавления агара в течение 7-10 суток на качалках. После мицелий отфильтровывали и равные навески помещали в колбы со свежей питательной средой. Контрольная группа не подвергалась никакому воздействию, в опытные группы добавлялись микроразмерные частицы оксида в концентрации 2 мг/мл (часть из них подвергались воздействию света; другие – находились в темноте). Культивирование грибов проводилось на шейкерах (150 об/мин) в колбах при температуре 27±2° С в течение 7 суток.

Определение активности экзооксидоредуктаз проводилось в культуральной жидкости спектрофотометрически: каталазы – по убыли H_2O_2 (= 240 нм) [4], пероксидазы – по окислению п-фенилендиамина в присутствии H_2O_2 (= 535 нм) [5]. Активность ферментов выражалась в условных единицах (у.е.). За единицу активности принималась изменение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 минуту, в пересчете на 1 мг общего белка. Результаты экспериментов представлены на рис. 1-2.

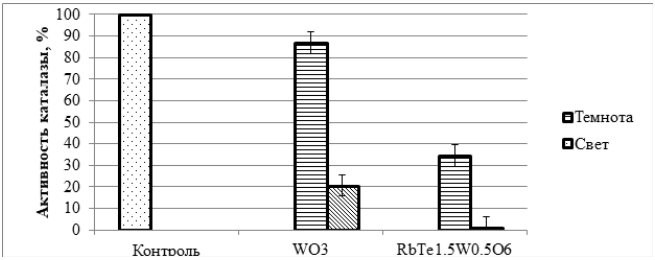


Рис. 1. Активность внеклеточной каталазы гриба *A. niger* в присутствии WO3 и RbTe1.5W0.5O6 в условиях темноты и при воздействии света.

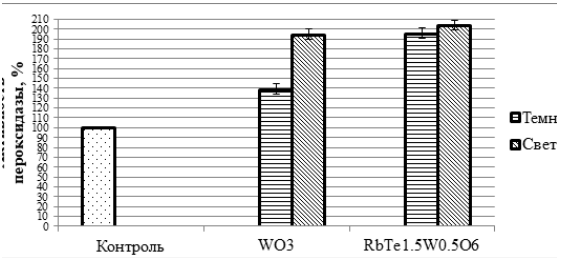


Рис. 2. Активность внеклеточной пероксидазы гриба *A. niger* в присутствии WO3 и RbTe1.5W0.5O6 в условиях темноты и при воздействии

света

Анализ данных, представленный на рисунках, показал, что исследуемые соединения снижали активность внеклеточной каталазы гриба *A. niger* как под действием света, так и в условиях темноты по сравнению с контролем. В условиях действия света ингибирующее влияние WO3 и RbTe1.5W1.5O6 на активность каталазы существенно возрастало. Причем более эффективно действовал на активность экзокаталазы сложный оксид металлов RbTe1.5W1.5O6, что может быть связано с наличием нескольких металлов в данном соединении.

Иная картина наблюдалась при исследовании действия соединений на активность внеклеточной пероксидазы гриба *A. niger*. В данном варианте активность фермента возрастала как в условиях действия света, так и в темноте. Причем действие света оказывало более сильное влияние на повышение активности экзопероксидазы. Отмечено, что для RbTe1.5W1.5O6 этот эффект был более выраженный по сравнению с WO3.

Предположительно ингибирование каталазы связано с взаимодействием оксидов тяжелых металлов со специфическими группами белковых компонентов данного фермента, такими как –SH, –NH , –COOH. Как правило, действие каталазы и пероксидазы сопряженно и можно наблюдать разнонаправленное изменение их активности. Кроме этого, можно предположить, что экзопероксидаза оказалась более устойчива к действию исследуемых соединений.

Данные результаты вносят существенный вклад в изучение действия мелкодисперсных частиц оксидов металлов, проявляющих фотокаталитическую активность, на микроорганизмы. Согласно результатам исследований соединения WO3 и RbTe1.5W0.5O6 обладают фотокаталитической активностью, усиливающей противогрибковый эффект и пролонгирующей их действие в условиях освещенности. Данный факт может иметь большое практическое значение, так как соединения WO3 и RbTe1.5W0.5O6 могут быть использованы не только в качестве биоцидов в различных отраслях промышленности, медицине, ветеринарии, но и в качестве дезинфекционных средств различных технологических сред и оборудования.

Весьма перспективным является создание самостерилизующихся поверхностей, содержащих мелкодисперсные частицы оксидов металлов, обладающих фотокаталитической активностью, так как в этом случае, меняя мощность источников освещения и характеристики волнового спектра, можно регулировать антимикробную активность избирательно по отношению к определенным видам микроорганизмов.

Список литературы

1. Yamamoto O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide // Int. J. Inorg. Mater. 2001. V.3. P.643.
2. Thabet S., Simonet F., Lemaire M. et al. Impact of Photocatalysis on Fungal Cells: Depiction of Cellular and Molecular Effects on *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V.80. P.642.
3. Захарова О.В., А. А. Гусев. Фотокаталитически активные микрочастицы оксида цинка и диоксида титана в клональном микроразмножении растений: перспективы // Российские нанотехнологии. 2019. Т.14, Вып.9-10. С.3-17
4. Li Y., Schellhorn H.E. Rapid kinetic microassay for catalase activity // J Biomol Tech. 2007. 18(4). P. 185-187.
5. Nagaraja P., Shivakumar A., Kumar Shrestha A. Development and evaluation of kinetic spectrophotometric assays for horseradish peroxidase by catalytic coupling of paraphenylenediamine and mequinol // Analytical Sciences. 2009. 25(10). P. 1243-1248.

ЗНАЧИТЕЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛАССИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*

Гагкаева Т.Ю.
Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Использование современных методов качественно изменили классификацию грибов *Fusarium* и привели к появлению новых проблем, которые продолжают вызывать бурные споры в научном сообществе.

1. В таксономии, основанной на морфологии, существовали независимо описанные анаморфы и телеоморфы грибов, однако, эта ситуация противоречила «Мельбурнскому Кодексу», не допускающему после 1.01.2013 использование двойной номенклатуры [1]. Только одно приоритетное научное название может быть применено к плеоморфным грибам, но препятствием для упразднения двойной номенклатуры являлась проблема установления связи между сумчатой и конидиальной стадиями грибов, преодолённая с внедрением ДНК технологий [2, 3]. Анаморфное имя *Fusarium* Link 1809: Fries 1821 [на основе *F. roseum* Link, син. = *F. sambucinum* Fuckel] конкурирует с телеоморфными именами *Gibberella Sacc.* 1877 [на основе *Gibberella pulicaris* (Fr.) *Sacc.*] и *Neocosmospora* E.F. Sm. 1899 [*Neocosmospora vasinfecta* E.F. Sm.]. Таким образом, название *Fusarium* опубликовано задолго до описания данных телеоморф и требуется приоритетно использовать данный эпитет над всеми конкурирующими эпитетами телеоморф [4, 5, 6].

2. В систематике допускается использование в качестве таксона исключительно только монофилетическую группу, объединяющую всех потомков одного предка. Применение филогенетического анализа выявило проблему полифилетичности секций р. *Fusarium*, основанных на сходстве морфологических признаков [7].

Серповидная форма конидий – иконический знак, в первую очередь определяющий грибы *Fusarium*, хотя *Fusarium*-подобные конидии встречаются у грибов нескольких порядков отдела *Ascomycota*, и это плезиоморфный признак [8, 9]. Для грибов семейства *Nectriaceae* распространение этого признака разобщено у таксонов более низкого уровня. В некоторых таксонах *Nectriaceae* макроконидии исчезли в жизненном цикле, в том числе, и некоторые виды *Fusarium* утратили способность к их образованию. Есть две возможные интерпретации наличия данного признака [10]: если *Fusarium*-подобные конидии являются плезиоморфными у *Nectriaceae*, то таксоны, формирующие такие конидии, являются парафилетическими. Менее вероятно, что образование *Fusarium*-подобных конидий эволюционировало в семействе несколько раз и таксон, ограниченный этим признаком, является полифилетическим.

В 2011 году на основе на мультилокусного филогенетического анализа группой исследователей было предложено разделение *Fusarium* sensu Wollenweber на две большие клады: "базальная группа", включающая виды *Gibberella*, и филогенетически неоднородная клада из линий, именуемых как "*Fusarium* подобные грибы". Таким образом, было высказано предположение, что род *Fusarium* является полифилетической группой и возможно его расщепление на несколько новых таксонов [10, 11, 12].

В дальнейшем опубликовано мнение исследователей, инициированное сотрудниками Института Вестердейка (ранее CBS-KNAW), предложивших свою концепцию, которая связывает понятие «*Fusarium*» только с грибами, имеющими телеоморфу *Gibberella* – *Fusarium* sensu Lombard et al. [13, 14, 15, 16, 17]. Ими было предложено в рамках семейства *Nectriaceae* разделить грибы, как минимум, на семь родов: *Fusarium* (де-факто замена *Gibberella*), *Albonectria*, *Bisifusarium*, *Cyanonectria*, *Geejayessia*, *Neocosmospora* и *Rectifusarium*. Самый важный предложенный шаг, приводящий к существенному изменению системы, – это выделение видов *F. solani* из таксона *Fusarium* в *Neocosmospora* sensu Sandoval-Denis et al. Исследователи утверждают, что опубликованная ими концепция отражает «более естественный» таксономический подход и, под родовым эпитетом *Neocosmospora*, описали ряд видов.

Однако сообщество исследователей, вовлеченных в изучение таксономии грибов *Fusarium*, настаивает на монофилетической концепции р. *Fusarium* sensu Geiser et al. [4, 5]. Нами поддерживается

данная концепция, показывающая, что нет смысла в расщеплении грибов *Fusarium* в пользу конкурирующих имен, в основном связанных с телеоморфными стадиями, которые наблюдаются относительно редко. Полученные новые филогенетические результаты отвергают аргументы в пользу разделения таксона, демонстрируя устойчивую монофилию *Fusarium*, включая грибы *F. solani* (как род *Neocosmospora*) [5]. Таким образом, большинство исследователей продолжает рассматривать виды *F. solani* как *Fusarium*, поскольку это лучший номенклатурный, научный и практичный таксономический ранг.

3. Гетерогенная структура рода *Fusarium* существует: ранее она была основана на секциях [18], а в настоящее время – монофилетических линиях (кладах), называемых комплексами видов [6]. В данное время род включает более 400 филогенетических видов, распределенных среди 23 комплексов видов *Fusarium*: *albidum* (FASC); *babinda* (FBABSC); *buharicum* (FBSC); *burgessii* (FBURSC); *buxicola* (FBUXSC); *concolor* (FCOSC); *chlamydosporum* (FCSC); *decemcellulare* (FDECSC); *dimerum* (FDSC); *fujikuroi* (FFSC); *heterosporum* (FHSC); *incarnatum-equiseti* (FIESC); *lateritium* (FLSC); *newnesense* (FNEWSC); *nisikadoi* (FNSC); *oxysporum* (FOSC); *redolens* (FRSC); *sambucinum* (FSAMSC); *solani* (FSSC); *staphyleae* (FSTASC); *torreyae* (FTORSC); *tricinctum* (FTSC); *ventricosum* (FVSC) [5, 19, 6, 20, 21]. Большинство видов грибов, которые оказывают значительное влияние на экономику, относятся к шести комплексам видов: FFSC, FIESC, FOSC, FSAMSC, FSSC и FTSC.

4. Молекулярно-генетический метод дал «инструмент», который привёл к катастрофическому увеличению числа видовых названий *Fusarium*, разобраться с которыми и удержать в памяти трудно даже работающим с этой группой грибов микологам.

Проблема филогенетической классификации также тесно связана с проблемой номенклатуры. Более 80% известных в настоящее время филовидов были обнаружены в течение последних 25 лет [22, 21]. Большинство из них формально описаны с помощью латинских биномов, но многим видовые названия пока не присвоены, хотя они явно представляют самостоятельные филовиды. Чтобы эти группы штаммов обозначить и сделать возможным обсуждение их статуса была введена неформальная система классификации, основанная на номерной номенклатуре, – выявленные филовиды обозначали арабскими цифрами. В частности, в комплексе *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) выявили и классифицировали 28 филовидов (FIESC 1–28) [23], за которыми вскоре последовали FIESC 29 и 30 [22] и FIESC 31 [24]. С привлечением дополнительных данных номерные филовиды получают узаконенные биномиальные латинские названия, и процесс этот сейчас происходит

очень активно.

5. Знание современных концепций классификации, внедрение молекулярных методов, наличие общей доступной базы данных ДНК грибов, позволяют разным научным коллективам работать в одном информационном поле и объединить усилия по изучению грибов.

Идентификация грибов *Fusarium* основывается на нуклеотидных последовательностях частей филогенетически информативных генов: фактора элонгации трансляции 1- (TEF1) и кодирующих субъединицы РНК полимеразы II (RPB1 и RPB2) [19, 20].

По этим ДНК последовательностям накоплены значительные базы данных и, в большинстве случаев, эти три гена совместно позволяют характеризовать изоляты на уровне вида или комплекса видов *Fusarium*. Как правило, последовательности TEF1 штаммов одного и того же вида, имеют идентичность ≥99,3%. Однако необходимо предвидеть некоторые исключения – идентичные последовательности TEF1 имеют виды группы *F. g*raminearum [25] и FSSC [26, 27, 28]. Напротив, два широко используемых локуса, внутренняя транскрибируемая спейсерная область (ITS рДНК) и 5'-конец большой субъединицы ядерной рибосомы (28S рДНК), слишком консервативны, чтобы различать границы видов *Fusarium*.

Идентификация изолята и установление его родства происходит на основании сравнения с последовательностями ДНК типовых штаммов, размещённых в ГенБанке [29]. Однако информативность ГенБанка часто недостаточная из-за большого количества ошибочно идентифицированных или представленных как «*Fusarium sp.*» последовательностей штаммов.

Современные названия, как правило, лучше отражают видовой статус, включая все типичные для организма свойства. Сегодня перед научным сообществом стоит цель не только выявления новых таксономических единиц, но и подробная характеристика их свойств, географического распространения и эколого-трофического поведения.

Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 19-76-30005).

Список литературы

1. Мельбурнский Кодекс, https://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php

2. Hawksworth D.L. IMA Fungus, 2012, 3: 15–24. Doi: 10.5598/imafungus.2012.03.01.03.

3. Gams W. Mycologia Iranica, 2014, 1: 1–5. Doi: 10.22043/MI.2014.2959.

4. Geiser D.M., Aoki T., Bacon C.W. et al. Phytopathol., 2013, 103: 400–408. Doi: 10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE

5. Geiser D. M., Al-Hatmi A.M.S., Aoki T. et al. Phytopathol., 2021, 111: 1064-1079. Doi: 10.1094/PHYTO-08-20-0330-LE

6. O'Donnell K., Rooney A.P., Proctor R.*H. e*t al. Genet. Biol., 2013, 52: 20–31. Doi: 10.1016/j.fgb.2012.12.004.

7. Kristensen R., Torp M., Kosiak B., Holst-Jensen A. Mycol. Res., 2005, 109: 173–186. Doi: 10.1017/S0953756204002114.

8. Seifert K. In book: *Fusarium*. APS PRESS., 2001, 15–28.

9. Summerbell R.C., Gueidan C., Schroers H-J. et al. Stud. Mycol., 2011, 68: 139–162. Doi: 10.3114/sim.2011.68.06.

10. Gr fenhan T., Schroers H.J., Nirenberg H.I., Seifrt K.A. Stud. Mycol., 2011, 68: 79–113. Doi: 10.3114/sim.2011.68.04.

11. Schroers H.J., Gr fenhan T., Nirenberg H.I., Seifert K.A. Stud. Mycol., 2011, 68: 115–138. Doi: 10.3114/sim.2011.68.05.

12. Rossman A.Y., Seifert K.A., Samuels G.J. et al. IMA Fungus, 2013, 4: 41–51. Doi: 10.5598/imafungus.2013.04.01.05.

13. Lombard L., van der Merwe N.A., Groenewald J.Z., Crous P.W. Stud. Mycol., 2015, 80: 189–245. Doi: 10.1016/j.simyco.2014.12.002.

14. Sandoval-Denis M., Crous P.W. Persoonia, 2018, 41: 109–129. Doi: 10.3767/persoonia.2018.41.06.

15. Sandoval-Denis M., Swart W.J., Crous P.W. MycoKeys, 2018, 34: 63–92. Doi: 10.3897/mycokeys.34.25974.

16. Sandoval-Denis M., Lombard L., Crous P.W. Persoonia, 2019, 43: 90–185. Doi: 10.3767/persoonia.2019.43.04.

17. Crous P.W., Lombard L., Sandoval-Denis M. et al. Stud. Mycol., 2021, 98: 100116. Doi: 10.1016/j.simyco.2021.100116.

18. Wollenweber H.W. Z. Parasitenkd., 1931, 3: 269–516. Doi: 10.1007/BF02120198.

19. Torres-Cruz T.J., Whitaker B.K., Proctor R.*H. e*t al. Plant Dis., 2022, 106: 1610–1616. Doi: 10.1094/PDIS-09-21-2105-SR.

20. O'Donnell K., Whitaker B.K., Laraba I. et al. Plant Dis., 2022, 106: 1597–1609. Doi: 10.1094/PDIS-09-21-2035-SR.

21. O'Donnell K., Humber R.A., Geiser D.M., et al. Mycologia, 2012, 104: 427–445. Doi: 10.3852/11-179.

22. O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G. et al. J. Clin. Microbiol., 2009, 47: 3851–3861. Doi: 10.1128/JCM.01616-09.

23. Villani A., Moretti A., De Saeger *S. e*t al. Int. J. Food Microbiol., 2016, 234: 24–35. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.023.

24. Sarver B.A.J., Ward T.J., Gale L.R. et al. Fungal. Genet. Biol., 2011, 48: 1096–1107. Doi: 10.1016/j.fgb.2011.09.002.

25. Hughes T.J., O'Donnell K., Sink *S. e*t al. Mycologia, 2014, 106: 686–697. Doi: 10.3852/13-318.

26. O'Donnell K., Sink S., Scandiani M.M. et al. Phytopathol., 2010, 100: 58–71. Doi: 10.1094/PHYTO-100-1-0058.

27. Tewoldemedhin Y.T., Lamprecht S.C., Vaughan M.M. et al. Plant Dis., 2017, 101: 150–157. Doi: 10.1094/PDIS-05-16-0729-RE.
28. ГенБанк, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov.

СТАРИННЫЕ ГЕРБАРИИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК МИКОБИОТЫ

Коротких А.И., Домрачева Л.И.
Вятский агротехнологический университет, Киров

О ценности старинных гербариев нам известно с давних времен, благодаря исследователям - ботаникам, которые бережно собирали и тщательно гербаризировали растения, стараясь сохранить первозданный вид флоры определенных местообитаний. Гербарии служат наглядным материалом студентам агрономических, биологических и ветеринарных профилей для изучения географического распространения видов, особенностей морфологии, систематики, экологии растений [1].

В последние два десятилетия гербарные образцы стали объектом исследовании по филогении и систематике, генетически-структурным изменениям в различные временные периоды и изучению генофонда благодаря внедрению методов молекулярной генетики [2]. Ценность гербариев представляется еще и в том, что старинные гербарные образцы оказались ценнейшим источником для оживления «спящей» микробиоты [3, 4]. Гербарии обладают продолжительным носительством на своей поверхности ризосферной и эпифитной микробиоты тех времен [5, 6]. При этом полученные результаты численности ризосферных и эпифитных группировок микроорганизмов оказались ниже тех, которые регистрируются при учете численности микроорганизмов со свежих образцов растений. Некоторые микроорганизмы могут сорбироваться и закрепляться на поверхности растения, тем самым сохранять свою жизнеспособность продолжительное время благодаря способности к спорообразованию и анабиозу. Примечательно при этом, что свою жизнеспособность могут сохранять не только спорообразующие бактерии, но и микромицеты, в частности представители рода *Trichoderma*. Эти грибы дважды были выделены с гербарных растений разных временных периодов: из ризосферы лютика ядовитого (*Ranunculus sceleratus* (L.)) семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*) (1899 г.) и с поверхности надземной части гвоздики (*Dianthus*) семейства Гвоздичные (*Caryophyllaceae*) (1949 г.) [7]. Грибная микробиота, представленная родом *Trichoderma*, стала типичным представителем как риосферной, так и эпифитной микобиоты гербарных образцов в наших исследованиях. Различные

виды грибов этого рода оказывают ингибирующее воздействие по отношению к фитопатогенным грибам, а так же антимикробное действие (выделяют свыше 100 различных антибиотиков), что служит основанием использования различных видов триходермы в биотехнологии для выпуска биопрепаратов (триходермин, трихозан, глиокладин), используемых в сельскохозяйственной практике как биопестициды для предотвращения инфекционных заболевай [8].

В наших исследованиях, проводимых на кафедре биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятского ГАТУ, выделенные в чистые культуры *Trichoderma sp.* шт. RS и *Trichoderma sp.* шт. D, предположительно обитающие в относительно чистых экотопах, представляют определенный интерес для исследования их биотехнологических возможностей. Поэтому в дальнейшем нами была изучена их антагонистическая активность против фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и условно-патогенной бактерии *Staphylococcus aureus*.

В качестве тест-объектов на антифузариозную активность выделенного микромицета *Trichoderma sp.* шт. RS были выбраны фитопатогенные грибы: *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* шт. Г/15, *F. poae* шт. Р-К/15, а в качестве тест-организма на антибактериальную активность был выбран условно-патогенный микроорганизм *Staphylococcus aureus*, выделенный из атмосферного воздуха транспортной зоны г. Кирова. Для сравнения антагонистической активности *Trichoderma sp.* шт. RS в опытах использовали гриб *Trichoderma lignorum*, входящий в состав биопрепарата Триходермин [9].

Было проведено три серии опытов. В 1-ой серии по изучению антагонистической активности *Trichoderma sp.* шт. RS, против 3-х видов фитопатогенных грибов *F. culmorum*, *F. oxysporum* и *F. p*oae в контрольных вариантах на дно стерильной чашки Петри заливали споровую суспензию фитопатогенных грибов. В опытных вариантах, кроме споровой суспензии фитопатогенов добавляли споровую суспензию *Trichoderma sp.* шт. RS и заливали расплавленной средой Чапека. При снятии опыта определяли степень зарастания поверхности питательной среды грибным мицелием. Результаты опыта показали, что триходерма по-разному воздействовала на грибные культуры: подавляла рост *F. culmorum* и *F. oxysporum* в 2 и в 3 раза по сравнению с контролем соответственно. В то же время она практически не влияла на развитие *F. p*oae (табл.).

Таблица 1. Влияние *Trichoderma sp.* шт. RS на степень развития фитопатогенных грибов на поверхности питательной среды (%).

Вариант	*Fusarium culmorum*	*Fusarium oxysporum*	*Fusarium poae*
Контроль	100	60	100
Trichoderma sp. шт. RS	50	20	100

Во 2-ой серии проводили сравнительный анализ антагонистической активности микромицетов *Trichoderma sp.* шт. RS и *Trichoderma lignorum* против наиболее распространенного в Кировской области фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum*. Для этого вносили агаровые диски культуры *Trichoderma sp.* шт. RS, вырезанные с газонов, растущих на среде Чапека, и дисков *T. lignorum*, входящего в состав биопрепарата триходермин, на предварительно выросшие газоны *F. culmorum*. Сравнение антагонистической активности двух штаммов триходермы показало, что *T. lignorum* способствует образованию зон лизиса на газоне фузариума, не превышающего 3 мм. В то же время *Trichoderma sp.* шт. RS практически полностью растворяет мицелий фузариума в диаметре, превышающем 10 мм.

В 3-й серии опытов проверяли антимикробную активность *Trichoderma sp.* шт. RS против условно-патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus*. Для этого на предварительно выращенный газон стафилококка на среде МПА вносили диски культуры микромицетов *Trichoderma sp.* шт. RS таким образом, что бы культуры соприкасались друг с другом. По истечению времени наблюдали за состоянием культуры стафилококка. Опыт показал, что *Trichoderma sp.* шт. RS обладает и определенной антистафилококковой активностью, вызывая зоны лизиса на газоне *Staphylococcus aureus*, достигающие 13 мм в диаметре.

Культуру *Trichoderma sp.* шт. D, выделенную с поверхности гвоздики на питательную среду Чапека, тестировали на антагонистическую активность против фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum*. Для этого методом укола по периметру одной чашки Петри с картофельно-глюкозным агаром вносили культуры триходермы и фузариума. При снятии опыта определяли степень зарастания поверхности питательной среды грибными мицелиями *Trichoderma sp.* шт. D и *Fusarium culmorum*. Результаты опыта показали, что к 10-м суткам *Trichoderma sp.* шт. D визуально вызывала лизис *Fusarium culmorum*.

Таким образом, проведенные исследования показали высокую степень антагонистической активности *Trichoderma sp.* шт. RS, выделенной из ризосферной почвы лютика ядовитого, по отношению к фитопатогенным

грибам *F. culmorum* и *F. oxysporum*. Кроме того, установлена достаточно высокая степень антибактериальной активности *Trichoderma sp.* шт. RS, вследствие чего данный штамм триходермы в перспективе может служить ингибитором стафилококковых инфекций.

Trichoderma sp. шт. D, выделенную с поверхности надземной части гвоздики, тестировали в качестве микроба-антагониста против фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum*. Отмечена литическая активность триходермы против данного вида фитопатогена, что дает возможность использовать *Trichoderma sp.* шт. RS для дальнейшего проведения опытов по ограничению фузариозной активности.

Список литературы

1. Пересторонина О. Н. Роль гербарной коллекции в ботаническом образовании высшей школы // Сибирский педагогический журнал. 2013. № 4. С. 160-164.

2. Фомина Н. А., Антонова О. Ю., Чухина И. Г., Гавриленко Т. А. Гербарные коллекции в молекулярно-генетических исследованиях. Turczaninowia. 2019. № 22 (4). С. 104-118.

3. Домрачева Л. И., Ковина А. Л., Симакова В. С., Берг А. А. Гербарные образцы бурых водорослей и биопленок Nostoc commune как носители микрофлоры // Экология родного края: проблемы и пути их решения: Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Т. 1. Кн. 2. Киров: Вятский государственный университет. 2018. С. 27-29.

4. Домрачева Л. И., Ковина А. Л., Малинина А. И., Вахмянина С. А., Шешегова Т. К. Старинные гербарии как источник "спящей" микрофлоры // Мелиорация почв для устойчивого развития сельского хозяйства: Материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящённой 100-летию со дня рождения профессора Александра Филипповича Тимофеева. Т. 1. Часть 1. Киров: Вятская государственная сельскохозяйственная академия. 2019. С. 149 156.

5. Valeria Bianciotto, Marc-Andre Selosse, Florent Martos, Roland Marmeisse. Herbaria preserve plant microbiota responses to environmental changes. Trends in Plant Science. 2022. 27 (2). pp.120 - 123.

6. Heberling, J. M., and D. J. Burke. 2019. Utilizing herbarium specimens to quantify historical mycorrhizal communities. Applications in Plant Sciences. 2019. 7 (4): e1223. doi:10.1002/aps3.1223

7. Ковина А. Л., Домрачева Л. И. Малинина А. И. 120-летняя сохранность ризосферной микрофлоры гербарных образцов растений семейства Ranunculaceae (Лютиковые) // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: Материалы XVI Всероссийской научно-

практической конференции с международным участием. Т.1. Кн. 1. Киров: Вятский государственный университет, 2018. С. 230-233.

8. Коломбет Л. В. Грибы рода *Trichoderma* - продуценты биопрепаратов для растениеводства. Биологические особенности, обеспечивающие их активность в качестве продуцентов биопрепаратов // Прикладная токсикология. 2010. № 1. С. 42-48.

9. Домрачева Л. И., Ковина А. Л., Малинина А. И., Люкина А. Л. Антимикробная активность микромицета *Trichoderma sp.*, выделенного из ризосферной почвы лютика ядовитого (*Ranunculus sceleratus*) // Экология родного края: проблемы и пути их решения: Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Киров: Вятский государственный университет. 2019. С. 217-219.

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ ШТАММОВ АГАРИКОМИЦЕТОВ

Максимова В.Ю.[1], Чернышенко В.С.[1], Ананьева Е.П.[1], Гурина С.В.[1], Псурцева Н.В.[2]

[1]Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

[2] Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Базидиальные грибы, являясь одним из наиболее разнообразных и экологически значимых классов грибов, обладают значительным потенциалом в биотехнологии. Исследования показывают, что многие виды агарикомицетов обладают лекарственными свойствами, которые могут быть использованы в фармации [1]. В связи с этим актуальной является работа по изучению возможностей использования базидиальных грибов в качестве продуцентов биологически активных веществ в медицине и биотехнологии.

Цель исследования – выявление ростового и биосинтетического потенциала новых штаммов базидиомицетов и отбор перспективных продуцентов для биотехнологических разработок. Задачами данной работы являлось: 1) верификация исследуемых штаммов с использованием ПЦР-анализа для идентификации и подтверждения их видовой принадлежности; 2) выявление культурально-морфологических свойств 80 штаммов при культивировании на агаризованной среде, в том числе, изучение их роста и ферментативных активностей; 3) сравнительная оценка скорости роста ряда отобранных штаммов на трех стандартных средах и подбор оптимальной среды для выращивания посевного

материала с целью последующего глубинного культивирования.

Объектами исследования являлись штаммы различных видов базидиомицетов, включающих агарикоидные, афиллофороидные и гетеробазидиальные грибы. В работе представлены номера штаммов, образцы которых были выделены в культуру в 2021 году в Приморском крае и введены в Коллекцию культур базидиомицетов Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (LE-BIN).

Штаммы выращивали на чашках Петри на среде сусло 4% – агар 2% (СА) при 24 ± 20С. В процессе культивирования замеряли линейную скорость роста культур (мм\сут), описывали и фотодокументировали макро- и микроморфологические признаки колоний, включая внешнюю линию, характеристику мицелиального мата, цвет, запах, обратную сторону колоний. Микроморфологические признаки вегетативного мицелия изучали в проходящем свете с использованием микроскопа Axio Scope A1 (Zeiss), характеризуя гифальную структуру, размер гиф, характер их ветвления, наличие пряжек, анастомозов, гифальных колец, структур бесполого размножения, кристаллов и других особенностей [2].

В процессе оценки биосинтетического потенциала штаммов в качестве модельных субстратов для определения протеолитической (ПА), целлюлолитической (ЦА), лигнолитической и лакказной (ЛА) активностей использовали желатин, микрокристаллическую целлюлозу, гваякол и сирингалдазин соответственно. Исследование проводили с колониями на 14 день роста.

Статистическую обработку проводили в Microsoft Office Excel, для расчета погрешности использовали метод стандартного отклонения.

Для подтверждения видовой принадлежности исследуемых штаммов проводили молекулярный анализ, основанный на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ). Использовали стандартную для базидиомицетов пару грибных праймеров 1F и 4B (4 – для гетеробазидиальных грибов), позволяющую амплифицировать участок яДНК ITS1-5,8S-ITS2, характерный для определения видовой специфичности: он включает в себя спейсер ITS1, высококонсервативный участок – 5,8S рибосомальный ген и спейсер ITS2 [3]. Подготовленные пробы с выделенной ДНК ставили в амплификатор BIO RAD C1000 Touch Thermal Cycler, программа для прямого проведения ПЦР (25 циклов), наличие ПЦР-продукта подтверждали с помощью электрофореза в агарозном геле. После очистки проб проводили секвенсовую ПЦР-реакцию уже с одним праймером (1F) для получения одноцепочечных фрагментов ДНК. Для очистки секвенсового продукта применяли магниты D-Pure. Процесс секвенирования на основе капиллярного электрофореза по методу Сэнгера проводили с использованием секвенатора ABI model

3130 (Applied Biosystems) в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Для анализа сиквенсов использовали программу MEGA XI. Полученные нуклеотидные последовательности депонировали в международный генетический банк NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Пример полученных результатов представлен в таблице 1, содержащей уточненную после ПЦР-анализа видовую принадлежность некоторых штаммов, а также данные ростовых и ферментативных характеристик. На основе результатов скрининга исследуемых культур были отобраны наиболее перспективные штаммы для изучения их биосинтетического потенциала в глубинной культуре.

Таблица 1. Сравнительная характеристика некоторых штаммов базидиомицетов.

Номер LE-BIN	**Вид на основе ПЦР-анализа**	**Номер NCBI**	**Скорость роста на СА, мм/сут**	**ЛА**	**ЦА**	**ПА**
LE-BIN 4794	*Stereum hirsut*um	OP508311	5,7 ± 0,4	++	22,8 ± 0,7	23,2 ± 0,7
LE-BIN 4812	*Mycoleptodonoides vassiljevae*	OP508328	5,9 ± 0,8	+++	21,0 ± 0,4	24,5 ± 1,0
LE-BIN 4823	*Trametopsis cervina*	OP508337	5,2 ± 0,2	–	18,5 ± 0,5	20,7 ± 0,9
LE-BIN 4805	*Gloeostereum incarnatum*	OP508322	9,1 ± 0,8	++	20,0 ± 0,5	17,7 ± 1,0
LE-BIN 4816	*Gymnopilus junonius*	OP508332	2,8 ± 0,2	++	следы	15,5 ± 0,5
LE-BIN 4820	*Coprinellus xanthothrix*	OQ428217	6,8 ± 0,5	–	26,7 ± 1,0	21,8 ± 0,9

Перед изучением процесса глубинного культивирования грибов был произведен подбор оптимальной среды для выращивания посевного материала. Для анализа использовали три стандартные коммерческих среды: солодово-ростковый экстракт 4% – агар 2% (СЭА), картофельно-

декстрозный агар (PDA AppliChem Panreac, Germany; состав среды: агар – 2%, глюкоза – 1%, экстракт картофеля – 0,4%), мальт экстракт (ME, Conda, Spain) 1,5% – агар (Difco) 2% (MEA). Штаммы выращивали при 24 ± 2°C в течение 14 дней или до полного зарастания поверхности субстрата мицелием. В процессе культивирования замеряли линейную скорость роста (мм\сут) и описывали морфологические признаки колоний. Выявлено, что наиболее высокие показатели скорости роста наблюдались на СЭА. На основе полученных результатов солодово-ростковый экстракт был выбран для получения посевного материала в дальнейших исследованиях процесса глубинного культивирования. Результаты средней скорости роста исследуемых штаммов на трех стандартных средах представлены на рисунке 1.

Таким образом, из 80 исследуемых штаммов были выявлены шесть наиболее перспективных, которые обладали наибольшей скоростью роста и ферментативной активностью: *Hericium erinaceus* LE-BIN 4837, *Mycoleptodonoides vassiljevae* LE-BIN 4812, *Hapalopsis croceus* LE-BIN 4826, *Coprinellus xanthothrix* LE-BIN 4820, *Gloeostereum incarnatum* LE-BIN 4805, *Flammulina fennae* LE-BIN 4806. Для них будет применена технология глубинного культивирования.

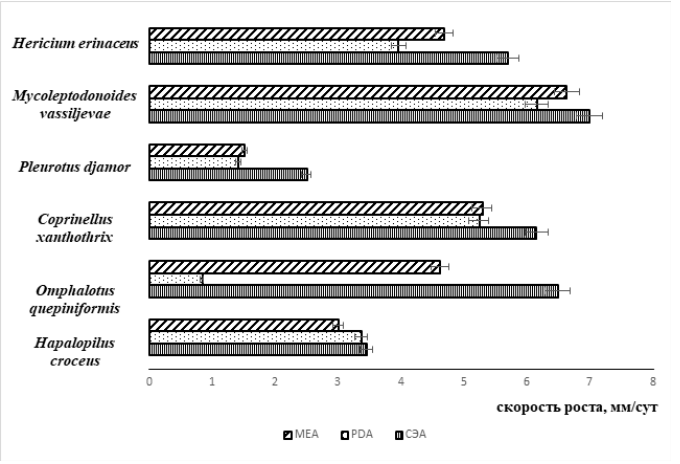


Рис. 1. Значения средней скорости роста отобранных штаммов на трех стандартных средах.

Работа была выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, проект БИН РАН № 122011900033-4.

Список литературы
1. Вассер С.П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». 2015. Т. 7, № 2. С. 238-248.
2. Бисько Н.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н.А.Бисько, А.С.Бухало, С.П.Вассер и др.; под общ. ред. И.А.Дудки. – Киев: Наукова думка, 1983. – 312 с.
3. Lemey P., Salemi M., Vandamme, A.M. eds. The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. Cambridge University Press, 2009. – 751 p.

ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ НА ИХ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Майорова И.В..[1], Сайнчук А.Д.[2] , Псурцева Н.В.[3]
[1]Санкт-Петербургский государственный университет
[2] Пущинский научный центр биологических исследований РАН
[3] Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Макромицеты, благодаря своему уникальному и одновременно разнообразному метаболическому профилю, нашли обширное применение в ряде биотехнологических областей начиная от использования в пищевой промышленностях, завершая активным использованием в медицине в качестве источника новых лекарственных молекул [1]. В биотехнологии для решения данных задач широкое применение нашли чистые культуры макромицетов. Основным и наиболее надежным источником штаммов, как для научных, так и для практических целей являются коллекции культур грибов, в которых сохраняется видовое и штаммовое разнообразие этих организмов. Целью сохранения биологического материала в коллекциях культур является поддержание чистоты, жизнеспособности и генетической целостности, предотвращение селекции разновидностей внутри популяций и уменьшение вырождения штаммов. Методы сохранения штаммов в коллекционных фондах играют важную роль в сохранении их жизнеспособности и биологической активности [2].

Целью настоящего исследования является изучение биохимических, физиологических и морфологических, молекулярно-биологических свойств важных с точки зрения потенциального применения в медицинской и пищевой промышленностях штаммов базидиомицетов, которые на протяжении длительного времени сохранялись в коллекции

методом криоконсервации в жидком азоте при -196 по сравнению с хранением методом суб-культуры на агаризованной питательной среде и периодическими пересевами. В работе были подробно исследованы штаммы *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. и *Gloeophyllum sepiarium*. (Wulfen) P. Karst. Грибы этих видов активно изучаются во всем мире и представляют интерес для практического применения.

Flammulina velutipes (энокитаке, иноки, зимний гриб) является ценным съедобным грибом, который нашел широкое применение в традиционной Восточной медицине. По мере развития технологий была установлена способность к синтезу ферментов, например, протеиназ, целлюлаз [3] и биологически активных метаболитов (энокипадины, фламвелутпеноиды, кадинены, стерпуролы, фламулинол и т.д.), имеющих противоопухолевую, антисклеротическую, иммуномодулирующую, противовоспалительную, антибактериальную, антигипертензивную, антиоксидантную активности, а также эффект улучшения липидного профиля [4].

Pleurotus ostreatus (вешенка обыкновенная) является активно культивируемым для пищевых целей грибом. Для *P. ostreatus* была описана возможность выработки молекул (ингибиторы диссоциации Rab GDP, супероксиддисмутазы, каталазы, теоредоксинредуктазы, сериновые протеиназцы, лектины, остреолизины, плевротолизины, катехины, кемпферолы, апигенины и т.д.), обладающих противоопухолевыми, противовирусными, иммуномодулирующими, противогельминтными эффектами. Авторы полагают, что употребление данных грибов может улучшить клинические показатели артериального давления, метаболизма глюкозы и липидов [5].

Gloeophyllum sepiarium (трутовник заборный), вызывающий бурую гниль древесины, не является съедобным грибом, однако в его составе были обнаружены вещества с противогрибковыми, антиоксидантными и противоопухолевыми свойствами (глеофиллолы, ооспонол, тирозол и т.д.) [6].

Активность анаболических процессов, в которых синтезируются искомые молекулы, изучают при помощи биохимических, морфологических, физиологических характеристик базидиомицетов. Таким образом, исследования вышеуказанных параметров позволяют определить наиболее оптимальные условия эффективного культивирования продуцентов, приводящим к получению оптимальных качественных и количественных показателей, выделяемых базидиомицетами активных соединений. При этом необходимо учитывать вопросы сохранения в коллекционных фондах наилучшим образом ростовых и биосинтетических свойств штаммов-продуцентов для возможности их практического использования

в течение длительного времени.

Материалом для исследования послужили штаммы из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН: *Flammulina velutipes* LE-BIN 0385 (получен в 1975 г.), *Gloeophyllum sepiarium* LE-BIN 0155 (1971 г.), *Pleurotus ostreatus* LE-BIN 0553 (1978 г.), которые хранились при 4 методом суб-культуры, а также их реплики, депонированные во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ) более 30 лет назад, сохраняющиеся там методом криоконсервации в жидком азоте при -196 , и полученные в 2019-ом году из ВКМ под номерами F-2537, F-2932, F-3449 соответственно. Видовая принадлежность штаммов была подтверждена секвенированием ярДНК. Микроморфологию изучали с использованием микроскопа Axio Scope.A1 (Zeiss, Германия) в проходящем свете. Для анализа линейного роста, макро- и микроморфологических и биохимических характеристик штаммы выращивали в чашках Петри 90 мм на стандартных коммерческих агаризованных средах MEA (1.5% мальц-экстракт, Conda; 2% агар, Difco) и PDA (картофеле-декстрозный агар, 1,9%, Applichem PanReac с добавлением агара 0,75%, Difco) при 25 °C в темноте в трех биологических повторностях.

Окислительную активность определяли экспресс-методом по интенсивности окисления сирингалдазина (1,0% в C2H5OH; Sigma, США) и гваякола (2,0% в H2O; Sigma, США) в трех биологических и трех аналитических повторностях через 5 минут, 1 час и 3 часа, оценивая интенсивность цветовой реакции по шкале от «-» (отсутствие активности) до «++» (наибольшая активность).

Протеолитическую активность (ПА) определяли в Чашках Петри 90 мм по интенсивности гидролиза желатиновой пленки (5 г пищевого желатина на 100 мл воды) за 48 часов инкубации при 25 °C в трех биологических и аналитических повторностях. Величину активности рассчитывали измерением диаметра зон с гидролизованным субстратом (мм) в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Целлюлолитическую активность (ЦА) определяли в Чашках Петри 90 мм по интенсивности гидролиза агаризованной (1%) микрокристаллической целлюлозы (1%) за 48 часов инкубации при 25 °C в трех биологических и аналитических повторностях. Зоны гидролиза проявляли при помощи 0,5% раствора I в 2% KI и замеряли их диаметр в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

В качестве величины погрешности использовали стандартное отклонение, статистическую обработку проводили в Microsoft Office Excel.

Результаты исследования линейной скорости роста штаммов показали (Рис. 1.), что рост реплик *F. velutipes* и *P. ostreatus* после криоконсервации значительно превосходил рост штаммов, сохраняемых методом

периодических пересевов. Для штамма *G. sepiarium* сохранялись те же тенденции, но разница в скорости роста была не так велика. Так, для штамма *F. velutipes* LE-BIN 0385 скорость роста на PDA составляла 4,0 ± 0,1 мм/сут, тогда как у реплики из ВКМ F-2537 – 7,0 ± 0,1 мм/сут; на MEA скорость их роста составляла 2,9 ± 0,1 и 5,4 ± 0,1 соответственно. Примерно такие же скорость роста и соотношение наблюдали и для вариантов штамма *Pleurotus ostreatus*. *Gloeophyllum sepiarium* показал самую низкую скорость роста (что связано с особенностями его биологии), а также меньшее различие между ВКМ и БИН культурами. Время полного зарастания чашек Петри 90 мм, отличающееся в 2 раза для культур *F. velutipes* и *P. ostreatus* с разным методом хранения, наглядно продемонстрировало преимущество криоконсервации как способа сохранения ростовой активности штаммов грибов. Культуры *G. sepiarium* практически не отличались временем зарастания чашки Петри как на разных средах, так и при разных методах хранения.

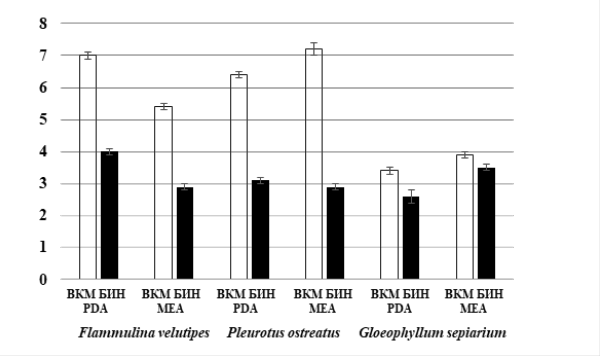


Рис. 1. Средний прирост мицелия различных базидиальных штаммов (картофельно-декстрозный агар, агар с экстрактом солода в качестве субстратов), мм/сут.

Исследование окислительных ферментов показало, что *Gloeophyllum sepiarium* не обладал активностью при окислении гваякола и сирингалдазина, вне зависимости от среды культивирования и способа хранения штаммов, так как он является грибом бурой гнили. У *Flammulina velutipes*, принадлежащей к грибам белой гнили, исследованный штамм отличался низкой активностью оксидоредуктаз, и четкой зависимости от среды культивирования и метода хранения штамма выявлено не было. *Pleurotus ostreatus* проявил наибольшую активность на среде MEA.

Таблица 1. Активность окислительных ферментов исследованных штаммов экспресс-методом.

Вид	Штамм	Среда	Сирингалдазин			Гваякол		
			5m	1h	3h	5m	1h	3h
Flammulina velutipes	ВКМ F-2537	PDA	-	-	-	-	-	-
	LE-BIN 0385		-	±	+	-	+	+
	ВКМ F-2537	MEA	±	±	±	±	±	±
	LE-BIN 0385		-	-	±	-	-	-
Pleurotus ostreatus	ВКМ F-3449	PDA	±	±	±	±	±	++
	LE-BIN 0553		±	±	±	±	±	++
	ВКМ F-3449	MEA	++	++	++	±	+	++
	LE-BIN 0553		+	++	++	±	+	++

Исследование желатиназной активности продемонстрировало, что *Gloeophyllum sepiarium* показал ЖА только тех штаммов, которые были получены из ВКМ (Рис. 2.). Остальные культуры имели небольшие различия, при этом культура *Pleurotus ostreatus* БИН на среде PDA демонстрировала наибольшую активность ЖА по сравнению с ВКМ, тогда как *Flammulina velutipes*, наоборот, показала более высокий результат у реплики ВКМ на обеих средах (Рис. 2).

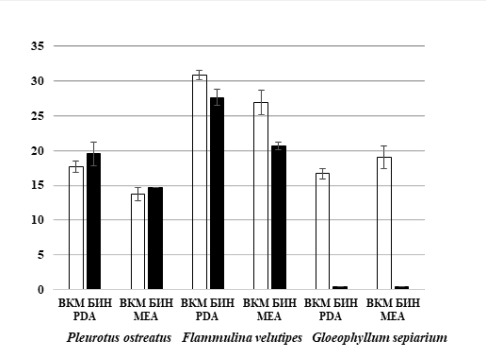


Рис. 2. Сравнительная характеристика ЖА у исследованных штаммов,

мм

В результате эксперимента по определению ЦА (Рис. 3.) *Flammulina velutipes* на среде PDA показала наибольшую активность; результаты ВКМ штамма оказались выше, чем БИН. В целом, результаты всех культур показали более высокие значения ЦА на PDA, при этом не было отмечено четкой корреляции между БИН и ВКМ культурами.

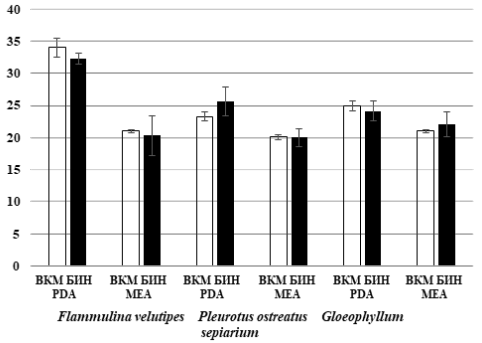


Рис. 3. Сравнительная характеристика ЦА у исследованных штаммов, мм.

Таким образом, было показано, что как ростовая, так и ферментативная активность реплик, сохраняемых в ВКМ, в большинстве случаев была выше, чем у штаммов LE-BIN. Полученные данные свидетельствуют о том, что длительное сохранение штаммов методом криоконсервации является более эффективным по сравнению с периодическими пересевами методом суб-культуры.

Работа была выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, проект БИН РАН № 122011900033-4.

Список литературы

1. Sch ffler A. Secondary metabolites of basidiomycetes. Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects. 2018: 231-275.
2. Комиссаров Н. С., Дьяков М. Ю., Гарибова Л. В. Методы длительного хранения культур макромицетов. Микология и фитопатология. 2023; 57(3): 1–19.
3. Denisova N.P. History of the study of trombolytic and fibrinolytic enzymes of higher basidiomycetes mushrooms at the V.L. Komarov Botanical Institute in Saint Petersburg, Russia. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2010; 12(3): 317-325.

4. Fukushima-Sakuno, E. Bioactive small secondary metabolites from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes*. J Antibiot. 2020; 73: 687–696.
5. Huang LH, Lin HY, Lyu YT, Gung CL, Huang CT. Development of a Transgenic *Flammulina velutipes* Oral Vaccine for Hepatitis B. Food Technol Biotechnol. 2019; 57(1): 105-112.
6. Rasser F, Anke T, Sterner O. Secondary metabolites from a *Gloeophyllum* species. Phytochemistry. 2000; 54(5): 511-516.

Глава 12

ЭКОЛОГИЯ ГРИБОВ И ЧЕЛОВЕКА

DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.12

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ НА РОССИЙСКОМ СЕГМЕНТЕ МКС – РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА

Алехова Т.А. [1], *Александрова А.В.* [1], *Загустина, Н.А.* [2]
[1] *МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва*
[2] *Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Москва*

На орбитальных станциях требуется поддержание строго контролируемых условий для обеспечение оптимальной работы оборудования и комфорта экипажа. Микроорганизмы являются непременными спутниками человека и везде сопутствуют нам, в их числе микроскопические грибы, которые составляют обязательный, но часто неконтролируемый, компонент нашей среды обитания. В ситуациях, благоприятствующих их развитию, они способны вызывать неблагоприятные последствия, повреждая продукты, материалы, ухудшая условия и отрицательно влияя на здоровье [1; 2; 3]. В связи с этим, в рамках сформированной в 1999 году в России «Долгосрочной программы научно-прикладных исследований и экспериментов, на Российском сегменте Международной Космической Станции РС МКС» проводится эксперимент «Начальные этапы биодеградации и биоповреждений в условиях космоса (Биодеградация)». Он продолжает мониторинговые исследования, начатые еще на станции Мир, и рассчитан на весь период эксплуатации МКС с отбором проб 2 раза в год. Его цель – контроль микробиологической обстановки и разработка методов обеспечения биобезопасности гермозамкнутых обитаемых аппаратов [4; 5]. Особенно важны исследования состава микроскопических грибов, так как, во-первых, они оказывают влияние на здоровье экипажа и, во-вторых, способны повреждать различные конструкционные материалы и оборудование.

Для проведения мониторинга на борту орбитального комплекса была создана специальная укладка «Биопробы», предназначенная для доставки устройства для отбора проб с различных внутренних поверхностей станции, хранения отобранных материалов и доставки их на Землю с целью проведения микробиологического анализа. Места забора проб – 20 точек – были согласованны с различными подразделениями ОАО РКК «Энергия» (материаловедами, проектантами, службой обеспечения жизнедеятельности) и находится в различных зонах возможного скопления и развития микроорганизмов. К настоящему времени, в рамках КЭ «Биодеградация» проведено 40 циклов исследований.

В ходе мониторинга, за весь его период, было выявлено 77 видов различных микроорганизмов: 51 вид мицелиальных грибов, относящихся к 16 родам; 2 дрожжевых гриба и 24 вида бактерий, представленных 17

родами. Виды грибов и бактерий, к которым отнесены исследованные штаммы, являются широко распространёнными и, как правило, сопутствующими в жилых и рабочих помещениях и связаны с продуктами и материалами, используемыми в деятельности человека.

Все выявленные мицелиальные грибы относились к группе анаморфных (несовершенных грибов). Среди них преобладали представители родов *Penicillium* (18 видов) и *Aspergillus* (12 видов). Среди грибов самыми распространенными являются *Penicillium chrysogenum* и *Rhodotorula sp.* Довольно часто выявляются *Aspergillus niger, A. sydowii, A. versicolor, A. flavus, Penicillium aurantiogriseum, P. spinulosum* и *Ulocladium botrytis.*

Эти наиболее обычные грибы составляют "ядро" микобиоты станции, они относятся к группе технофилов и способны образовывать органические кислоты. Кроме того, представители рода *Aspergillus*, и многие виды из рода *Penicillium* являются токсинообразователями и условными патогенами, их споры могут быть причиной аллергических заболеваний. Все выделенные грибы относятся к группе технофилов и способны образовывать органические кислоты.

Регулярные исследования позволили проследить динамику общей численности и видового состава микробиома РС МКС. Заселенность станции микроорганизмами, по данным получаемым с использованием укладки «Биопробы», менялась волнообразно, но в целом была невысока. Выделено две крупные волны, на которые накладываются более мелкие колебания численности, видового богатства и степени заселенности РС МКС. На первом этапе формирования микобиоты. видовой состав сильно варьировал, регулярно выявляли новые для станции виды, а встреченные ранее пропадали. С 2005 г. произошла некоторая стабилизация видового состава, определились места благоприятные для развития микрогрибов, и началось постепенное их накопление в отдельных точках. На первой волне, количество одномоментно выявляемых видов достигало 11. В 2009 г. произошел резкий спад, и в следующее десятилетие наблюдали вторую волну с показателями аналогичными первой. Далее, после резкого спада снова начался процесс постепенного накопления.

Изучению состава микробиоты, попадающих на искусственные космические объекты, уделяется огромное внимание [6; 7; 8]. С одной стороны, это необходимо для решения практических задач, поскольку микроорганизмы, и особенно грибы, способны повреждать конструкционные материалы [9; 10], а также оказывать негативное воздействие на здоровье экипажа [3]. С другой стороны, они являются модельными объектами позволяющим изучать воздействие факторов полёта на живые организмы [11; 12; 13].

В результате проводимого на станции многолетнего мониторинга можно

сделать следующие заключения. Вселяются микромицеты, связанные с человеком, уже освоившие внутренние пространства помещений. Заселение происходит постоянно, но остаются только те, которые находят для себя подходящие условия и устойчивы к неблагоприятным факторам полета. Таким образом, на РС МКС формируется комплекс видов, сходный с таковыми в жилых помещениях, но менее богатый видами. Это связано, в первую очередь с тем, что именно из наземных помещений и происходит заселение станции. Грибы проникают с грузами и космонавтами, эти грибы уже приспособились к местообитаниям, созданным человеком, многие из них способны развиваться при недостатке влажности на очень бедных субстратах и обладают ферментативным аппаратом способным разрушать сложные полимеры.

В результате работ сформирована коллекция чистых культур микроскопических грибов, выделенных с конструкционных поверхностей станции Мир и РС МКС на разных сроках эксплуатации [5]. Также в нее включены культуры аналогичных видов, выделенные из природных местообитаний, используемые для сравнительных исследований.

Штаммы микроскопических грибов, освоившие конструкционные материалы и поверхности внутри РС МКС не проявляют заметных отличий от своих аналогов их наземных местообитаний, к аналогичные выводы были сделаны и в отношении бактериальных культур [14].

Список литературы

1. Novikova N., De Boever P., Poddubko S., et al. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. Research in microbiology. 2006; 157(1): 5–12.

2. Gu J.D. Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. International biodeterioration & biodegradation. 2007; 59(3): 170-179.

3. Blachowicz A., Venkateswaran K., Wang C.C. Persistence of Fungi in Atypical, Closed Environments: Cultivation to Omics. Methods in Microbiology. 2018; 45: 67–86.

4. Алехова Т.А., Александрова А.В., Новожилова Т.Ю., Лысак Л.В., Загустина Н.А. Эксперимент «Начальные этапы биодеградации и биоповреждений в условиях космоса». Вестник Московского Университета. Сер. 16. Биология. 2008; 4: 27–33.

5. Алехова Т.А., Александрова А.В., Загустина Н.А., Новожилова Т.Ю., Романов С.Ю. Микроскопические грибы на Российском сегменте Международной космической станции. Микология и фитопатология. 2009; 43(5): 9–19.

6. Castro V.A., Thrasher A.N., Healy M., Ott C.M., Pierson D.L. Microbial

characterization during the early habitation of the International Space Station. Microbial ecology. 2004; 47(2): 119–126.

7. Satoh K., Yamazaki T., Nakayama T. et al. Characterization of fungi isolated from the equipment used in the International Space Station or Space Shuttle. Microbiology and immunology. 2016; 60(5): 295–302.

8. Satoh K., Alshahni M.M., Umeda Y. et al. Seven years of progress in determining fungal diversity and characterization of fungi isolated from the Japanese Experiment Module KIBO, International Space Station. Microbiology and Immunology. 2021; 65(11): 463–471.

9. Алехова Т.А., Загустина Н.А., Александрова А.В., Новожилова Т.Ю., Борисов В.А., Плотников А.Д. Мониторинг начальных этапов биоповреждений конструкционных материалов, применяемых в авиакосмической технике методами электронной микроскопии. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2007; 7: 53–59.

10. Плотников А.Д., Корнеева Е.Ю., Алехова Т.А., Загустина Н.А. Исследования влияния биокоррозионных поражений на механические характеристики образцов из алюминиевых сплавов АМг6 и 1570С применительно к условиям эксплуатации РС МКС. Космическая техника и технологии. 2017; 4: 36–5.

11. Cortesao M., Luo J., M ller D. et al. Growth and biofilm formation of *Penicillium chrysogenum* in simulated microgravity. 12th conference of the VAAM special group Molecular Biology of Fungi. 2017; 117269.

12. Romsdahl J., Blachowicz A., Chiang A. J. et al. International Space Station conditions alter genomics, proteomics, and metabolomics in *Aspergillus* nidulans. Applied microbiology and biotechnology. 2019; 103(3): 1363–1377.

13. Blachowicz A., Romsdahl J., Chiang A.J. et al. The International Space Station environment triggers molecular responses in *Aspergillus niger*. Frontiers in microbiology. 2022; 13: 893071.

14. Mora M., Wink L., K gler I. et al. Space Station conditions are selective but do not alter microbial characteristics relevant to human health. Nature communications. 2019; 10(1): 3990.

НАЧАЛО ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭНТОМОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ ПОРЯДКА *HYPOCREALES* НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Бочкарева Ю.В., Богачева А.В.
ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, Владивосток

После длительного перерыва в Приморском крае были возобновлены

исследования энтомофильных грибов, составляющих обособленную экологическую группу, виды которой достаточно широко распространены в природе и характеризуются доминирующим признаком - трофическими связями с насекомыми и паукообразными (Коваль, 1983). Объектом нашего исследования являются представители порядка *Hypocreales* (семейства *Cordycipitaceae* и *Ophiocordycipitaceae*), относящиеся к сумчатым грибам (*Ascomycota*) (http://www.indexfungorum.org/names/names.asp). Помимо аскомицетов, грибы, имеющие в качестве хозяев насекомых, есть и среди представителей других отделов - *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* и *Oomycota*. В экосистеме энтомофильные грибы регулируют численность членистоногих, в том числе и насекомых-вредителей леса и сельскохозяйственных угодий (Воронина и др., 2001; Горюнова и др., 2009). Проведенные ранее исследования показали, что территория Приморья обладает высоким видовым разнообразием по данной группе грибов - насчитывается порядка 70 видов. Так, например, в Сибири насчитывается 5-6 видов, в Европейской части России и прилегающих территориях (страны Прибалтики, Белоруссия, Украина, Грузия) - около 15. Таким образом, Приморский край является лидером по биоразнообразию энтомофильных грибов в пределах нашей страны. Стоит также обратить внимание на довольно явное сходство местной микобиоты с биоразнообразием Восточной и Юго-Восточной Азии и других тропических стран: *Cordyceps gemella Moureau* и *C. pseudoinsignis Moureau* (из экваториальной Африки), *C. erotyli* Petch (Индия, Южная Америка), *Ophiocordyceps purpureostromata* (Kobayasi) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (Япония) (Борисов и др, 2005). Такое сходство с тропическими регионами обусловлено теплым и влажным летом, способствующим бурному процветанию микобиоты и энтомофауны, представители которой является пищевым ресурсом для энтомофильных грибов (так, на территории Лазовского заповедника насчитывается порядка 6000 видов насекомых) (Ануфриев и др., 2009). С 2020 года нами были продолжены прерванные на 15 лет исследования энтомофильных грибов. Сначала была проведена ревизия неидентифицированных образцов, собранных на Дальнем Востоке в период с 60х годов прошлого века по 2020 год. Для пополнения коллекции Бочкаревой Ю.В. были исследованы дубняки Партизанского района Приморского края в летний период 2019 и 2020 гг. Также имела место более крупная экспедиция в Комсомольский заповедник (Хабаровский край) в 2022 году с целью изучения общего разнообразия микобиоты ООПТ, а также оценки обилия энтомофильных грибов на ее территории. К сожалению, с последней задачей не удалось справиться в полной мере, энтомофильные грибы в сборе исчислялись единичными экземплярами: один образец O. stylophora

(Berk. & Broome) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora и три образца – O. spicatus L.S. Zha & P. Chomnunti. Возможно, сказался неудачный выбор сезона для посещения (экспедиция была в середине июля, а пик роста энтомофильных грибов в южной и центральной частях Дальневосточного региона приходится на август) или причина была в засушливом лете, выпавшим на тот год. Но, стоит отметить, что и эти образцы обладают определенной ценностью. Так, O. spicatus, который был совсем недавно описан как новый для науки вид, ранее был известен только с территории Китая (Ling-Sheng Zha et al., 2021). И пока что не было официального подтверждения о находках этого вида в России. Но на данный момент нельзя делать однозначные выводы о его распространении на территории нашей страны, так как еще не были проведены молекулярно-генетические исследования собранного материала, и филогенетический статус образцов не был определен. Ясно осознавая необходимость получения генетических данных, нами было принято решение о начале работы в этом направлении. На данный момент было получено 5 последовательностей для *Cordyceps militaris* (Fr.), и 11 для *Ophiocordyceps nutans* (Pat.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora. В качестве маркера был выбран ядерный ген LSU (28S DNA), являющийся консервативным и имеющий невысокое разрешение. Тем не менее его использование оправдано, так как вначале требуется лишь приблизительная оценка родства собранного материала как внутри выборки, так и с базой данных. Последовательности *C. militaris* при сравнении с данными из NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) не показали практически никаких отличий с ними, внутри самой выборки последовательности были идентичны. Куда более информативным оказался анализ последовательностей *Ophiocordyceps nutans*, внутри выборки которого можно с уверенностью выделить 4 генотипа, довольно сильно отличающихся как между собой, так и с последовательностями, взятыми из базы данных. Вполне вероятно, что разные генотипы принадлежат представителям разных подвидов, выделенных внутри вида *Ophiocordyceps nutans*. Также есть вероятность того, что уровень отличий выше и касается уже определения видового статуса. Но такие выводы можно будет сделать, только исходя из сравнения данных по нескольким локусам ядерных и митохондриальных маркеров. Такого рода исследования будут продолжены нами в ближайшее время.

Список литературы

Коваль, Э.З. Энтомофильные грибы СССР.: дис. … д-р. биол. наук: / Коваль Элеонора Захаровна. - Киев, 1983. - 410 с.

Воронина Э.Г., Леднев Г.Р., Мукомолова Т.Ю. Энтомофильные грибы // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под

редакцией В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. С. 271 - 351.

Горюнова О.Б. Разработка биологического препарата для борьбы с личинками комаров. Автореферат дисс. … канд. техн. наук / РХТУ им. Д.И. Менделеева. М., 2009. 25 с.

Борисов Б.А., Жирков В.М., Глупов В.В., Леднев Г.Р., Володина Л.И., Лиховидов В.Е., Согонов М.В. Роль Лазовского заповедника в сохранении биоразнообразия грибов сем. *Clavicipitaceae* - потенциальных продуцентов биопестицидов и фармацевтических препаратов // Научные исследования природного комплекса Лазовского заповедника. Труды Лазовского государственного природного заповедника им.Л.Г. Капланова. 2005. Вып.3. С. 27-51.

Ануфриев Г.А., Белокобыльский С.А., Беляев Е.А. и др. Насекомые Лазовского заповедника. – Владивосток: Дальнаука, 2009. – 464 с

Zha L.-S., Kryukov V.Y., Ding J.-H., Jeewon R., Chomnunti P. Novel taxa and species diversity of *Cordyceps* sensu lato (*Hypocreales*, *Ascomycota*) developing on wireworms (Elateroidea and Tenebrionoidea, Coleoptera) // MycoKeys. - 2021. - №78. - P. 79–117

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОНСОРЦИУМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ВОССТАНОВЛЕНИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ЗЕМЕЛЬ

Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Исупова А.А.
Удмуртский государственный университет, Ижевск

Аннотация. Проведены исследования пределов устойчивости к действию различных концентраций нефти у ряда изолятов (культур) микроскопических эндотрофных грибов, выделенных из урбанопочв с высоким уровнем загрязнения. Выявлены широкие пределы толерантности микроскопических грибов *Fusarium equiseti* и *Cylindrocarpon magnusianum* к содержанию нефти. Исследована эффективность очистки и восстановления биологической активности нефтезагрязненных земель при использовании консорциума биоремедиантов: биопрепарата «Микрозим Петро Трит», содержащего ряд бактерий деструкторов нефти, фиторемедианта (Мятлик луговой Роа *pratensis L.*) и микроскопических грибов. Проведен лабораторный эксперимент по моделированию 5 и 10% загрязнения земель (разного гранулометрического состава) нефтью. Установлена наибольшая эффективность при использовании *Cylindrocarpon magnusianum*. По окончании эксперимента в вариантах с 5% внесением нефти на обоих типах почв и при 10% загрязнении нефтью (супесь) содержание нефти было достоверно ниже, чем в контроле (использование

лишь биопрепарата). На среднесуглинистой почве при 5 и 10% содержании нефти показатель инвертазной активности почв по окончании эксперимента превышал контроль в варианте фитомелиорант+грибы, и максимально в варианте полного консорциума биоремедиантов. На супесчаных почвах достоверное увеличение биологической активности почв по сравнению с контролем установлено лишь при 5% внесении нефти и лишь в варианте в использования полного консорциума мелиорантов. Полученные результаты позволяют констатировать эффективность совместного действия биопрепарата и микроскопических грибов в очистке и восстановлении нефтезагрязненных почв.

В природных условиях с непостоянством климатических и физико-химических параметров, а также наличием факторов, ингибирующих рост микроорганизмов, продолжительность утилизации нефтяных углеводородов значительно возрастает и требует многократного внесения биопрепаратов и минеральных удобрений. Существует проблема узкого диапазона применения углеводородокисляющих микроорганизмов при проведении биологического этапа рекультивации нефтезагрязненных почв. Появляется необходимость в применении биологических препаратов совместно с популяциями других биологических агентов, которые способны не только поддерживать необходимый микроэлементный состав в очищаемой почве, но и полностью формировать почвенную экосистему. Такими биологическими агентами являются, к примеру, микроскопические эндотрофные грибы, которые способны усиливать роль нефтеразрушающих микроорганизмов и повышать устойчивость растений при проведении биологического этапа рекультивации земель. Микроскопические эндотрофные грибы создают благоприятную среду для углеводородокисляющих микроорганизмов, поддерживая оптимальное значение pH почвенного раствора, уровень влажности почвы, эффективное использование минеральных элементов[1, 2-5].

Были проведены исследования по выявлению пределов устойчивости к действию различных концентраций нефти у ряда изолятов (культур) микроскопических эндотрофных грибов, выделенных из урбанопочв с высоким уровнем загрязнения [6, 7, 8]. Микромицеты высаживали на субстраты с внесением нефти в различных концентрациях, наблюдали за динамикой роста и размерами колоний мицелия грибов (таблицы 1 и 2). Оба микромицета способны выживать при высоких концентрациях нефти (до 10%) в субстрате, но они используют разные механизмы для выживания. *Fusarium equiseti* в начале эксперимента отличался активным ростом, далее наблюдалось снижение скорости роста колоний. *Cylindrocarpon magnusianum*, наоборот, в начале эксперимента не отличался активным ростом (период адаптации), а со второй недели эксперимента

проявлял высокие показатели роста колоний мицелия. Таким образом, можно отметить видоспецифические стратегии адаптации грибов в условиях нефтяного загрязнения, которые показали, что оба вида можно использовать в технологиях биорекультивации, но при разных условиях. *F. equiseti* целесообразно использовать при низких концентрациях нефти в субстрате и при необходимости быстрого восстановления почвы. *C. magnusianum* рекомендовано использовать при длительном нефтяном загрязнении и высоких концентрациях нефти.

Таблица 1. Скорость роста колоний мицелия *Fusarium equiseti* (мм/сут.)

	Контроль	Содержание нефти в субстрате				
		1%	2,5%	5%	7,5%	10%
1 неделя	6,5	6,8	7,2	6,8	2,5	2
2 недели	2,3	2,7	1,9	2,3	3,4	2,5
3 недели	2	0,9	0,3	0	1,6	0

Таблица 2. Скорость роста колоний мицелия *Cylindrocarpon magnusianum* (мм/сут.)

	Контроль	Содержание нефти в субстрате				
		1%	2,5%	5%	7,5%	10%
1 неделя	2	1,4	1,3	1,1	0,9	0,7
2 недели	4,5	4	2,9	3,4	2,1	2,3
3 недели	2,9	3,7	0,3	2	1,9	3,2

Далее в условиях лабораторных экспериментов было исследовано влияние сочетания биопрепарата «Микрозим Петро Трит», содержащего ряд бактерий деструкторов нефти, и микроскопических грибов на эффективность разложения нефти. Опыт включал ряд вариантов: биопрепарат «Микрозим Петро Трит» (Контроль); фиторемедиант (мятлик луговой - Poa *pratensis L.*); фиторемедиант + микроскопические грибы; «Микрозим Петро Трит» + фиторемедиант + микроскопические грибы (консорциум). Эксперимент проводился на двух типах почв по гранулометрическому составу: супесь и средние суглинки.

Продолжительность эксперимента составила 6 месяцев. Эксперимент был проведен в моделируемых условиях климатической камеры BINDERKBWF: дневной режим: температура +23°C, максимальное

освещение 15000 лк и вентиляция; ночной режим: температура +18°С, вентиляция и отсутствие освещения. Вносили согласно схеме эксперимента «Микрозим Петро Трит» в виде водной суспензии из расчета 1 и 1.5 г на 1 кг почвы в вариантах 5 и 10% загрязнения нефтью соответственно. Спустя 10 дней в соответствующие схеме варианты опыта были посеяны семена мятлика лугового (норма высева 10–15 г/м2). Через 10 дней после прорастания семян в соответствующие варианты опыта была внесена грибная суспензия (25 мл на 1 делянку). Для производства суспензии («Способ приготовления и внесения микромицетного биопрепарата для повышения устойчивости растений», патент на изобретение 2722206 С1, 28.05.2020) [9], были использованы культуры эндотрофных микромицетов *F. equiseti* и *C. magnusianum*.

По завершении эксперимента был проведен анализ почв на содержание нефти (ПНД Ф 16.1:2.2.22-98) [10, 11, 12], а также инвертазной активность почв (метод В.Ф. Купреевича, Т.А. Щербаковой). Обработку результатов эксперимента проводили с использованием статистического пакета Statistica 13.0.

Результаты исследований показали наибольшую эффективность использования в консорциуме *Cylindrocarpon magnusianum*. По окончании эксперимента установлено, что в вариантах с 5% внесением нефти (средние суглинки), ее содержание составило: в Контроле 9900±1500 мг/кг; в вариантах фиторемедиант и фиторемедиант + грибы 13800±3500 и 10100±2500 мг/кг соответственно, что находится в рамках статистической погрешности. Достоверно эффективные различия получены при использовании полного консорциума ремедиантов и составило 5400±1600 мг/кг. Также достоверная разница результатов установлена и при 10% загрязнении, причем именно при использовании консорциума ремедиантов (Контроль - 20300±2100 и полный консорциум - 14300±2800). На супесчаных почвах также зафиксировано достоверное снижение содержания нефти в варианте полного консорциума по сравнению с контролем (11000±2800 и 7000±1300 соответственно), но лишь при моделировании 5% загрязнения почв нефтью.

Также оценивали показатель биологической (инвертазной) активности почв. На среднесуглинистой почве при 5 и 10 % содержании нефти показатель инвертазной активности почв превышал контроль (11.5±1.4, доверительный интервал среднего значения 10.1…12.9 и 13.5 ± 1.1 доверительный интервал 12.4…14.6 соответственно) в варианте фиторемедиант + грибы (18.2±0.7 доверительный интервал 17.5…18.9 и 21.1 ± 0.8 доверительный интервал 20.3…21.9 соответственно) и максимально в варианте полного консорциума биоремедиантов (19.9±0.7, доверительный интервал 19.2…20.6 и 22.3 ± 0.9, доверительный

интервал 21.,4…23.,2 соответственно при 5 и 10% загрязнении нефтью). На супесчаных почвах достоверное увеличение биологической активности почв по сравнению с контролем установлено при 5% внесении нефти в варианте в использования полного консорциума ремедиантов (27.6±2.4, доверительный интервал 25.2…30.0, где контроль 21.0±3.3, доверительный интервал 17.7…24.3)

Данные результаты позволяют констатировать эффективность совместного действия биопрепарата и микроскопических грибов в очистке и восстановлении нефтезагрязненных земель.

Список литературы

1. Лямзин В.И., Бухарина И.Л., Здобяхина О.В., Исламова Н.А. и др. Исследование эффективности совместного применения биопрепарата нефтедеструктора и эндотрофных грибов на этапе биологического восстановления нефтезагрязненных земель // Астраханский вестник экологического образования. –2018. – № 3 (45). – С. 94-98.

2. Domka A. M. Are Fungal Endophytes Merely Mycorrhizal Copycats? The Role of Fungal Endophytes in the Adaptation of Plants to Metal Toxicity [Электронный ресурс] / A. M. Domka, P. Rozpadek, K. Turnau // Frontiers in Microbiology. – Vol. 10. – 2019.

3. Halleen F., Schroers H.J., Groenewald J.Z., Crous P.W. Novel species of *Cylindrocarpon* (Neonectria) and Campylocarpon gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (Vitis *spp.*) // Studies in Mycology. – Vol. 50. – 2004. – P.431–455.

4. Hou L., Yu J., Zhao *L. a*nd He X. Dark Septate Endophytes Improve the Growth and the Tolerance of *Medicago sativa* and Ammopiptanthus mongolicus Under Cadmium Stress // Frontiers in Microbiology. – Vol. 10. – 2020. – P. 1-17.

5. Maci Vicente J.G., Jansson H. B., Talbot N.J., Lopez Llorca L.V. Real time PCR quantification and live cell imaging of endophytic colonization of barley (Hordeum *vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and Pochonia chlamydosporia // New Phytologist. – Vol. 182 (1). – 2009. – P. 213-228.

6. Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Жавад А.Ф., Абдуллах М.Р. и др. Влияние инокулята *Cylindrocarpon magnusianum* на формирование адаптивных реакций растений к стрессовым факторам // Аграрная Россия. – 2019. – № 12. – С. 26-32.

7. Bukharina I.L., Islamova N.A., Lebedeva M.A. Species of fungi in the root system of woody plants in urban plantations // The Fourth International Scientific Conference Ecology and Geography of Plants and Plant Communities. Сер. "KnE Life Sciences" –2018. – P. 49-55.

8. Bukharina I., Franken P., Kamasheva A., Vedernikov K. and Islamova N. About the species composition of microscopic fungi in soils and woody plant

roots in urban environment // International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – Vol.7 (4). – 2016. – P. 1386-1394.

9. Бухарина И.Л., Исламова Н.А. Патент на изобретение 2722206 С1, 28.05.2020. «Способ приготовления и внесения грибного биопрепарата для повышения устойчивости растений».

10. ГОСТ Р 54039-2010. Экспресс-метод спектроскопии в ближней инфракрасной области для определения содержания нефтепродуктов.

11. Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов практическое руководство. 2000.

12. Рябов В.Д. Химия нефти и газа: учебное пособие. – М.: ИД «ФОРУМ». 2009. С.336.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТАЛЛОВ НА НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ ГРИБА *LENTINUS EDODES* CNMN FB 01 В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Дворнина Е.Г., Чилочи А.А., Булимага В.П., Лаблюк С.В., Матрой А.А.
Технический университет, Кишинев,Молдова

Несомненный интерес представляет исследование влияния некоторых элементов на рост и развитие съедобных грибов, поскольку одним из наименее изученных аспектов биохимии физиологии высших грибов справедливо считается их отношение к различным макро- и микроэлементам (1).

Было изучено влияние координационных соединений (КС) металлов (бария, стронция и кальция) с одним и тем же лигандом, а также самого лиганда и координационного соединения Fe(III) другой структуры, содержащего в качестве лиганда шиффово основание: 2,6-diacetylpiridin-bis-(picolinoilhydrazon)-bis-(aqua)fier(III), на накопление грибной биомассы базидиомицета *Lentinus edodes* CNMN FB 01 в динамике его глубинного культивирования (6, 7, 8 сутки). Координационные соединения вносились в питательную среду в трех концентрациях – 5, 10, 15 мг/л. Для контрольного варианта использовалась питательная среда без координационных соединений.

Полученные результаты представлены в таблице и показывают, что в контрольном варианте без КС уровень накопления биомассы составил 15,32 г/л (6 сутки), 15,29 г/л (7 сутки) и 16,37 г/л (8 сутки). Результаты показывают, что на 6 и 7 сутки культивирования продуцента количество синтезируемой биомассы практически совпадает, а максимум ее синтеза наблюдается на 8 сутки.

Использование координационных соединений в оптимизированных вариантах показывает, что они по-разному влияют на биосинтез грибной биомассы базидиомицета, в зависимости от входящего в их состав атома комплексообразователя.

Так, координационное соединение с барием на 6 сутки культивирования штамма при всех использованных концентрациях обеспечивает стимулирующий эффект, который составляет 46,9% (5 мг/л); 45,0% (10 мг/л) и 42,7% (15 мг/л) в расчете от контроля этого же дня (15,32 г/л). В расчете от максимального контроля восьмых суток (16,37 г/л) стимулирующий эффект несколько меньше и составляет 37,6% (5 мг/л); 35,7% (10 мг/л) и 33,6% (15 мг/л). Как видно из представленных результатов с увеличением использованной концентрации до 15 мг/л стимулирующий эффект уменьшается. Но это уменьшение незначительно.

На 7 сутки культивирования базидиомицета наблюдается снижение стимулирующего эффекта, который в зависимости от использованной концентрации КС с барием составил 31,7% (5 мг/л); 35,7% (10 мг/л) и 30,3% (15 мг/л) в расчете от контроля седьмых суток (15,2 г/л). А в расчете от максимального контроля восьмых суток (16,37 г/л) стимулирующий эффект несколько меньше и составляет 23,0% (5 мг/л); 26,3% (10 мг/л) и 21,7% (15 мг/л).

На 8 сутки культивирования продуцента стимулирующий эффект практически не меняется, оставаясь на уровне стимулирующего эффекта 7 суток: 20,7% (5 мг/л); 23,3% (10 мг/л) и 20,8% (15 мг/л) в расчете от максимального контроля 8 суток (16,37 г/л).

Таким образом, результаты эксперимента показали, что комплексное соединение с барием ускоряет биосинтез грибной биомассы *Lentinus edodes* CNMN FB 01 на 48 часов, обеспечивая на 6 сутки культивирования базидиомицета не только достижения уровня максимального контроля восьмых суток, но и его превышение на 37,6% - 33,6% в зависимости от использованной концентрации (2).

Аналогичные результаты получены для комплексного соединения со стронцием. Его использование на 6 сутки культивирования базидиомицета при всех концентрациях обеспечивает возникновение стимулирующего эффекта, который несколько ниже, чем у КС с барием. Его уровень составил 36,6% (5 мг/л); 33,7% (10 мг/л) и 32,4% (15 мг/л) в расчете от контроля этого же дня (15,32 г/л). В расчете от максимального контроля восьмых суток (16,37 г/л) стимулирующий эффект несколько ниже, составляя 27,8% (15 мг/л); 25,2% (10 мг/л) и 23,9% (15 мг/л).

Таблица. Влияние комплексных соединений металлов (Ba, Sr, Ca) с одним и тем же лигандом, а также самого лиганда и КС с железом на

накопление биомассы гриба *Lentinus edodes* CNMN FB 01 в динамике глубинного культивирования (г/л).

КС	конц., мг/л	6 сутки		7 сутки		8 сутки	
		биомасса, г/л	%	биомасса, г/л	%	биомасса, г/л	%
$[Ba(L)_3$-$\mu(NCS)_2$-$Co(NCS)_2]$	5	22,52	146,9	20,14	131,7	19,76	120,7
	10	22,22	145,0	20,67	135,7	20,19	123,3
	15	21,87	142,7	19,92	130,3	19,79	120,8
$[Sr(L)_3]$ $[Co(SCN)_4]$	5	20,93	136,6	20,58	134,6	19,33	118,1
	10	20,49	133,7	20,15	131,8	18,09	110,5
	15	20,28	132,4	19,40	126,9	17,97	109,8
$Ca(L)_3]$ $[Co(SCN)_4]$	5	17,18	112,1	16,30	106,6	16,54	101,0
	10	17,30	112,9	15,77	103,1	16,36	99,9
	15	16,81	109,7	14,87	97,2	15,53	94,8
Ligand (L)	5	15,15	98,9	17,96	117,5	17,66	107,9
	10	16,41	107,1	17,81	116,5	17,19	105,0
	15	15,53	101,4	15,81	103,4	16,98	103,7
$[Fe(H_2L_1)(H_2O)_2]$ $NO_3)_3 \cdot 2{,}5H_2O$	5	16,24	106,0	17,95	117,3	17,99	109,9
	10	16,43	107,2	17,38	113,7	17,28	105,6
	15	16,10	105,1	17,06	111,5	17,78	108,6
Контроль	-	15,32	100,0	15,29	100,0	16,37	100,0

С увеличением концентрации координационных соединений стимулирующий эффект снижается, но это снижение незначительно. На 7 сутки культивирования штамма наблюдается снижение стимулирующего эффекта: 34,6% (5 мг/л); 31,8% (10 мг/л) и 26,9% (15 мг/л) в расчете от контроля седьмых суток (15,29 г/л). В расчете от контроля восьмых суток, когда наблюдается максимум синтеза грибной биомассы (16,37 г/л), стимулирующий эффект составил 25,7% (5 мг/л); 23,1% (10 мг/л) и 18,5% (15 мг/л).

На 8 сутки культивирования продуцента наблюдается еще большее снижение стимулирующего эффекта. В этот период он составил 18,1% (5 мг/л); 10,5% (10 мг/л) и 9,8% (15 мг/л). Из представленных результатов видно, что независимо от периода культивирования штамма (6, 7, 8 сутки) увеличение использованной концентрации от 5 мг/л до 15 мг/л

приводит к некоторому снижению стимулирующего эффекта.

Таким образом, анализ полученных результатов показывает, что координационное соединение со стронцием ускоряет биосинтез грибной биомассы базидиомицета *Lentinus edodes* CNMN FB 01 на 48 часов, обеспечивая на 6 сутки культивирования штамма не только достижения уровня максимального контроля 8 суток, но и его превышение на 27,8%-23,9% в зависимости от использованной концентрации.

Эффективность использования комплексного соединения с Ca значительно ниже, чем от использования КС с барием и стронцием. На 6 сутки культивирования продуцента стимулирующий эффект составил 12,1% (5 мг/л); 12,9% (10 мг/л) и 9,7% (15 мг/л) в расчете от контроля этого же дня. В расчете от максимального контроля восьмых суток (16,37 г/л) стимулирующий эффект представлен незначительными величинами – 4,9% (5 мг/л); 5,7% (10 мг/л) и 2,7% (15 мг/л). С увеличением концентрации стимулирующий эффект снижается. На 7 и 8 сутки воздействие данного координационного соединения близкое к нейтральному.

Изучение биологических свойств самого лиганда показало, что его слабое стимулирующее воздействие проявилось только при концентрации 10 мг/л на 6 сутки культивирования продуцента: на 7,1% (в расчете от контроля того же дня) и на 1,6% (в расчете от максимального контроля восьмых суток). На 7 сутки культивирования стимулирующий эффект несколько выше и проявился при концентрациях 5 мг/л и 10 мг/л, составляя 17,5% и 16,5% (в расчете от контроля седьмых суток) и 9,7% и 8,8% (в расчете от максимального контроля восьмых суток). На 8 сутки стимулирующее воздействие сохраняется в меньшей степени, составляя при этих концентрациях 7,9% (5 мг/л) и 5,0% (10 мг/л). Анализ результатов показал, что вклад лиганда в возникновение стимулирующего воздействия КС с барием и стронцием на синтез грибной биомассы *Lentinus edodes* CNMN FB 01 незначителен, а обусловлен биологическими свойствами атомов коплексообразователей.

Тестирование комплексного соединения другой структуры [Fe(H2L1)(H2O)2]NO3)3·2,5H2O, содержащего в качестве комплексообразователя атомы Fe, показало, что его использование в среде культивирования базидиомицета на 6 сутки обеспечивает возникновение слабого стимулирующего эффекта при всех применяемых концентрациях. Он составил 5,1%-7,2% в расчете от контроля того же дня (15,32 г/л). Однако, в пересчете от максимального контроля восьмых суток (16,37 г/л) стимулирующий эффект исчезает. На 7 сутки стимулирующий эффект несколько выше, составляя 17,3% (5 мг/л); 13,7% (10 мг/л) и 11,5% (15 мг/л) в расчете от контроля того же дня. А в расчете от максимального контроля восьмых суток стимулирующий эффект несколько ниже – 9,6% (5 мг/л);

6,2% (10 мг/л) и 4,2% (15 мг/л). Увеличение концентрации тестируемого КС от 5 мг/л до 15 мг/л в незначительной степени снижает величину стимулирующего эффекта. На восьмые сутки культивирования продуцента стимулирующий эффект представлен примерно теми же величинами от 5,6% до 9,9%.

Эксперимент показал, что комплексное соединение [Fe(H2L1)(H2O)2] NO3)3·2,5H2O ускоряет синтез грибной биомассы *Lentinus edodes* CNMN FB 01 на 24 часа, обеспечивая на 7 сутки культивирования продуцента достижения уровня максимального контроля восьмых суток с некоторым его превышением, наиболее значительным при использовании концентрации 5 мг/л (9,6%).

По результатам данного эксперимента можно сказать, что к числу наиболее перспективных координационных соединений можно отнести соединения, содержащие в качестве комплексообразователей барий и стронций. Их использование ускоряет синтез биомассы *Lentinus edodes* CNMN FB 01 на 48 часов, обеспечивая на 6 сутки культивирования базидиомицета достижения уровня максимального контроля 8 суток, а также его превышение на 37,6%-33,6% (КС с барием) и на 27,8%-23,9% (КС со стронцием) в зависимости от использованной концентрации. Для практического применения биомассы данного щтамма в медицине и в качестве биодобавки требуются дополнительные исследования по биохимическому составу.

Список литературы

1.Панкратов А. Н., Лощинина Е. А., Цивилева О. М., Бурашникова М. М., Казаринов И. А., Былинкина Н. Н., Никитина В. Е. Ростовые и метаболические эффекты ксенобиотической органической формы селена в культуре базидиомицета *Lentinula edodes* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2012. Т. 12, вып. 1. С. 11-17. DOI: 10.18500/1816-9775-2012-12-1-11-17

2. Ciloci Alexandra, Dvornina Elena, Rudic Valeriu, Bulhac Ion, Ureche Dumitru, Cocu Maria. Procedeu de cultivarea submers a tulpinii *Lentinus edodes* (Berk) Sing CNMN FB 01. Brevet de inven ie MD 4843. BOPI 1/2023, p. 47-48.

ПРОЯВЛЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ СРЕДЫ

Федосеева Е.В.[1], Сергеева Ю.Д.[2], Волкова В.Д.[2], Терехова В.А.[1,2]

[1]Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова, Москва

[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение

Каждая естественная почва потенциально обладает некоторой способностью

подавлять активность фитопатогенных грибов. Специфическое подавление основано на активности отдельной группы микроорганизмов, которые антагонистичны патогенам [1]. На способность почвы подавлять активность фитопатогенных грибов оказывают влияние абиотические (например, количество органического вещества) и биотические факторы (активность бактериальных сообществ). Естественными супрессорами фитопатогенных почвенных грибов являются грибы-антагонисты, среди которых выделяют представителей родов *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Cladosporium*, *Fusarium* (непатогенные виды) [2, 3]. Развитие фитопатогенных видов грибов ассоциировано с химическим загрязнением почв. Известно, что в загрязненных почвах увеличивается доля фитопатогенных грибов на фоне снижения долей бактерий и грибов-антагонистов фитопатогенных грибов, то есть естественных агентов биологического контроля численности фитопатогенных грибов [4, 5].

Целью данной работы было изучение антагонистической активности почвенных микромицетов в лабораторных условиях при культивировании в разных условиях среды. Химическое загрязнение моделировали внесением тяжелых металлов (ТМ). Разное количество органического вещества создавали внесением дополнительного альтернативного источника углерода.

Материалы и методы

Объектами исследования были почвенные штаммы: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Fusarium oxysporum* Schltdl. 1824, *Trichoderma harzianum* Rifai 1969, и *Clonostachys rosea* (Preuss) Mussat 1901. *T. harzianum* и *C. rosea* были выбраны как виды, которые потенциально могут обладать антагонистической активностью. *A. alternata* и *F. oxysporum* относятся к фитопатогенным видам. Микромицеты инкубировали при 22 °С в чашках Петри, содержащих агаризованную среду Чапека (3 г/л сахарозы). Катионы ТМ добавляли в среду в форме солей (нитраты Cu, Pb и Zn) для достижения необходимых концентраций. В среды вносили дополнительный альтернативный источник углерода в виде гуминовых препаратов (ГП): лигногумат и угольный ГП в концентрации 0,02 г/л. Расчет радиальной скорости роста (РСР) осуществляли по формуле: РСР = R/Δt, где R – радиус колонии, мм; Δt – продолжительность культивирования, час. Согласно [6] и на основании диапазона значений радиальной скорости роста грибам присваивали кинетический тип (Кг). Индекс толерантности (ИТ) грибов рассчитывали по формуле: ИТ (%) = показатель роста (радиус колонии) при обработке /показатель роста (радиус колонии) без обработки. Значения ИТ ранжировали следующим образом [7]: 0,00–0,39 – очень низкая устойчивость к металлу; 0,40–0,59 – низкая металлостойкость; 0,60–0,79 – умеренная металлостойкость; 0,80–0,99 – высокая металлостойкость; 1,00–>1,00 – очень высокая устойчивость к металлу. Антагонистическую активность грибов, потенциально обладающих супрессорной активностью по отношению к фитопатогенам, оценивали методом встречных культур (Matarese et al., 2012). Диски, вырезанные с края активно растущей колонии антагониста и патогена, помещали в чашку Петри с агаризованной питательной средой Чапека, учитывали радиус колонии патогена, как обращенный навстречу колонии антагониста (Ra), так и в

перпендикулярном (контрольном) направлении (Rc). Эксперименты проводили в 3-5 повторностях. Все расчеты проводились в статистических программах Excel и ExcelStat.

Результаты

Медь являлась наиболее токсичным ТМ для исследованных микромицетов. Внутри исследованной группы микромицеты проявляли разную устойчивость к воздействию ТМ (таблица 1). К действию Pb наибольшую устойчивость проявлял быстрорастущий гриб *T. harzianum*: даже при действии 1 г/л Pb ИТ = 0,37. К действию Zn наибольшую устойчивость проявлял медленнорастущий гриб *C. rosea*: об этом говорят самые высокие значения ИТ при всех концентрациях Zn. При этом значения ИТ гриба *T. harzianum* при действии Zn также были сравнительно высокими. *C. rosea* был наиболее устойчивым к действию Cu. На основании полученных данных можно предложить ряды устойчивости грибов к действию Cu, Pb и Zn (по степени снижения). К действию Pb: *T. harzianum* *C. rosea* *A. alternata* *F. oxysporum*. К действию Zn: *C. rosea* *T. harzianum* *F. oxysporum* *A. alternata*. К действию Cu: *C. rosea* *A. alternata* ≥ *T. harzianum* *F. oxysporum*.

Таблица 1. Показатели роста микромицетов и индексы толерантности к тяжелым металлам (*T. harzianum* – 3 дня, *C. rosea* – 7 дней, A.*alternata* – 6 дней, *F. oxysporum* – 4 дня).

КС	конц., мг/л	6 сутки		7 сутки		8 сутки	
		биомасса, г/л	%	биомасса, г/л	%	биомасса, г/л	%
$[Ba(L)_3\text{-}\mu(NCS)_2\text{-}Co(NCS)_2]$	5	22,52	146,9	20,14	131,7	19,76	120,7
	10	22,22	145,0	20,67	135,7	20,19	123,3
	15	21,87	142,7	19,92	130,3	19,79	120,8
$[Sr(L)_3][Co(SCN)_4]$	5	20,93	136,6	20,58	134,6	19,33	118,1
	10	20,49	133,7	20,15	131,8	18,09	110,5
	15	20,28	132,4	19,40	126,9	17,97	109,8
$Ca(L)_3][Co(SCN)_4]$	5	17,18	112,1	16,30	106,6	16,54	101,0
	10	17,30	112,9	15,77	103,1	16,36	99,9
	15	16,81	109,7	14,87	97,2	15,53	94,8
Ligand (L)	5	15,15	98,9	17,96	117,5	17,66	107,9
	10	16,41	107,1	17,81	116,5	17,19	105,0
	15	15,53	101,4	15,81	103,4	16,98	103,7
$[Fe(H_2L_1)(H_2O)_2]NO_3)_3\cdot 2{,}5H_2O$	5	16,24	106,0	17,95	117,3	17,99	109,9
	10	16,43	107,2	17,38	113,7	17,28	105,6
	15	16,10	105,1	17,06	111,5	17,78	108,6
Контроль	-	15,32	100,0	15,29	100,0	16,37	100,0

За счет высокой скорости роста гриб *T. harzianum* способен проявлять себя активный территориальный антагонист. Внесение ГП вызывает эффект

неспецифической активизации роста грибов. Наиболее выраженно происходит активизация роста более быстрорастущих культур. Поэтому на средах с ГП антагонистические свойства *T. harzianum* усиливаются по отношению к грибам с меньшей скоростью роста (*A. alternata* и *F. oxysporum*) (рис. 1д,е; рис. 2 д,е). Усиление антагонистических свойств *T. harzianum* также проявляется на средах с Pb, к действию которого этот гриб более устойчив среди других изученных (рис. 1б; рис. 2б). На средах с Zn выраженного усиления антагонистической активности *T. harzianum* не происходит (рис. 1в; рис. 2в), а на средах с Cu вообще происходит ингибирование роста этого гриба (рис. 1бг; рис. 2г).

Гриб *C. rosea*, характеризующийся невысокой скоростью роста, при этом проявил высокую устойчивость к действию ТМ. На средах с внесением Pb, Zn и ГП отмечается активизация роста быстрорастущего гриба *F. oxysporum* (рис. 4б,в,д,е). Внесение Cu ингибирует рост *F. oxysporum*, а *C. rosea* оказывается устойчивым к действию этого ТМ (рис. 4г). Поэтому в присутствии Cu клоностахис может быть потенциально более конкурентоспособен по сравнению с фитопатогенным фузариумом.

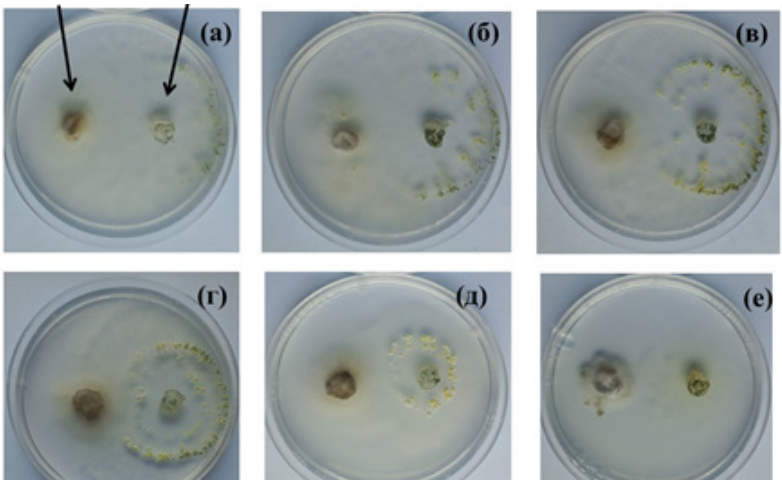


Рис 1. Фиксация антагонистических свойств методом встречных культур в паре *A. alternata* и *T. harzianum*: а) на среде Чапека (контроль); б) Pb 0,05 г/л; в) Zn 0,05 г/л; г) Cu 0,01 г/л; д) лигногумат 0,02 г/л; е) угольный ГП 0,02 г/л.

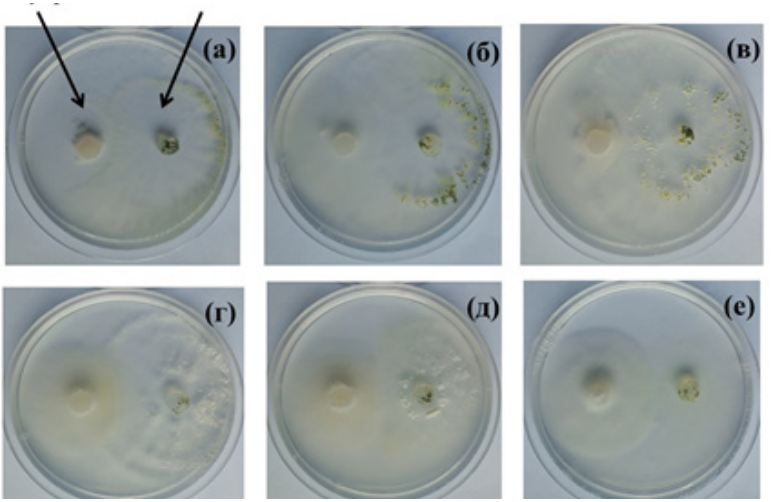


Рис 2. Фиксация антагонистических свойств методом встречных культур в паре *F. oxysporum* и *T. harzianum*: а) на среде Чапека (контроль); б) Pb 0,05 г/л; в) Zn 0,05 г/л; г) Cu 0,01 г/л; д) лигногумат 0,02 г/л; е) угольный ГП 0,02 г/л.

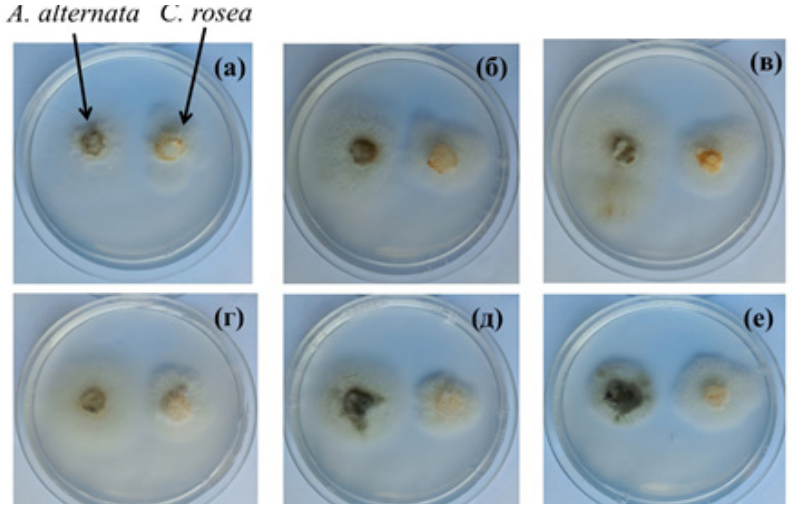


Рис 4. Фиксация антагонистических свойств методом встречных культур в паре *F. oxysporum* и *C. rosea*: а) на среде Чапека (контроль); б) Pb 0,05 г/л; в) Zn 0,05 г/л; г) Cu 0,01 г/л; д) лигногумат 0,02 г/л; е) угольный ГП 0,02 г/л

Способность к проявлению антагонистических свойств зависела от

трех факторов: скорости роста гриба, уровня устойчивости к ТМ и присутствия дополнительных источников углерода. *T. harzianum* ведет себя как наиболее активный территориальный антагонист на средах с Pb и ГП в отношении грибов с меньшей скоростью роста (*A. alternata* и *F. oxysporum*). Медленно-растущий *C. rosea* может быть потенциально более конкурентоспособен по сравнению с фитопатогенными грибами с большей скоростью роста только за счет своей высокой устойчивости к ТМ. *C. rosea* с небольшой скоростью роста в целом обладает меньшим потенциалом супрессорной активности по сравнению с быстрорастущей *T. harzianum*.

Благодарности

Авторы благодарят к.б.н. Иванову А.Е. за предоставление штаммов из коллекции кафедры биологии почв Факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа выполнена при поддержке РНФ, грант 22-24-00799 «Устойчивость и механизмы биохимических адаптаций почвенных грибов, обладающих фитопатогенной и антагонистической активностью, в условиях химического загрязнения» (https://rscf.ru/en/project/22-24-00799/).

Список литературы

1. Mazzola M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. Antonie Van Leeuwenhoek. 2002. 81 (1–4): 557–564.
2. Matarese F., Sarrocco S., Gruber S., Seidl - Seiboth V., Vannacci G. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. Microbiology. 2012. 158: 98—106.
3. Соколова Г. Д., Глинушкин А. П. Антагонисты фитопатогенного гриба *Fusarium* graminearum. Микология и фитопатология. 2017. 51 (4): 191–200.
4. Мосина Л. В. Микроскопические грибы в структуре микробного ценоза как индикаторы антропогенного загрязнения почв. Успехи медицинской микологии. 2019. 576-578.
5. Федосеева Е. В., Иванова А. Е., Терехова В. А. Структурные изменения почвенной микобиоты в условиях антропогенного загрязнения почв. В сборнике «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии». Изд-во БНЦ СО РАН. 2021. 490-492.
6. Полянская Л. М., Кочкина Г. Н., Кожевин П. А., Звягинцев Д. Г. Кинетическое описание структуры комплексов почвенных актиномицетов. Микробиология. 1988. 57 (5): 854-859.
7. Oladipo O. G., Awotoye O. O., Olayinka A., Bezuidenhout C. C., Maboeta M. S. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. Brazilian journal of microbiology. 2018. 49:

29–37.

СОРБЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ АНТАРКТИЧЕСКИМИ МИКРОМИЦЕТАМИ, КОЛОНИЗИРУЮЩИМИ ГОФРОКАРТОН.

Гончарова И.А.[1], Тригубович А.М.[2], Гигиняк Ю.Г.[3], Соколова Т.Н.[4], Сосновская Н.Е.[4]

[1]Белорусский научно-исследовательский институт документоведения и архивного дела, Минск

[2]Институт микробиологии НАН Беларуси? Минск

[3]НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам, Минск

[4]Институт природопользования НАН Беларуси, Минск

Гофрокартон широко используется для изготовления упаковки благодаря целому ряду преимуществ перед другими материалами. Основным сырьем при производстве гофрокартона является макулатура, экологичность которой не всегда бывает на приемлемом уровне. Типографские краски, содержащие тяжёлые металлы, до недавнего времени применялись повсеместно, не исключены они и в наши дни, особенно в цветных красителях. В зеленых пигментах обычно присутствует никель, белых – цинк и свинец, красных и синих – медь [1]. Особую опасность для здоровья тяжелые металлы представляют при попадании в дыхательные пути.

Картон является легкодоступным питательным субстратом для микромицетов, обладающих способностью аккумулировать тяжелые металлы [2]. Особую значимость экологические проблемы приобретают в полярных условиях. На Белорусской антарктической станции (БАС) «Гора Вечерняя» колонии плесневых грибов на коробках из гофрокартона визуально не были выявлены. В то же время микологический анализ проб скоплений пыли показал присутствие на станции ксеротолерантных штаммов *Aspergillus fumigatus*, формирующих в экстремальных условиях мало заметные паутинистые колонии, для которых лимитирование источников питания и влаги способствовало ускорению развития, увеличению размера и летучести спор [3].

Цель данного исследования – изучить сорбирующую активность по отношению к ионам тяжелых металлов антарктических изолятов микромицетов, колонизирующих внутренний слой гофрокартона без явных признаков его плесневения.

Объектами исследования служили грибные изоляты с непигментированным мицелием, выделенные из образцов пыли БАС. Культивирование грибов на стадии отбора проводили в чашках Конвея. Грибы высевали на агаризованную среду Чапека-Докса (ЧДА) с 12% NaCl, залитую в один из внешних полуцилиндров, второй полуцилиндр наполняли водой. Стерильный образец

картона помещали во внутреннюю камеру чашки. Через 7 суток инкубации при температуре 15оС образцы переносили в пустые чашки и инкубировали еще 14 суток. Затем из образца картона извлекали внутренний гофрированный слой, суспезировали в стерильной воде, капли суспензии распределяли по поверхности ЧДА в чашках Петри диаметральными штрихами. Рост однотипного мицелия по штрихам свидетельствовал о колонизации грибом внутреннего слоя гофрокартона.

При оценке сорбционной активности грибы выращивали стационарно в 100 мл колбах Эрленмейера с 20 мл среды Чапека-Докса. Сорбцию металлов биомассой оценивали по уменьшению концентрации соответствующих ионов после контакта сорбента с растворами солей: CuSO4, NiSO4, Pb(NO3)2, ZnSO4. Содержание ионов металлов в растворах до и после сорбции оценивали методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Сорбционную емкость рассчитывали по формуле: S = (Сисх – Сравн.). Vраст / mсорб, где S – сорбционная емкость, мг/г; Сисх. и Сравн. – исходная и равновесная концентрации соответственно, мг/мл; Vраст – объем исследуемого раствора, мл; mсорб – масса сорбента, г. Коэффициент распределения Kd (мл/г) рассчитывали по формуле Kd = S / Сравн.

Было выявлено, что в смоделированных условиях споры, осевшие на образцы картона сверху, не прорастают. Но в местах примыкания образца к стеклянной стенке внутренней камеры чашки Конвея споры некоторых грибов смогли прорасти, часть из них образовали точечные колонии, а 3 гриба (*Paecilomyces variotii*, *Penicillium verrucosum*, *Trichoderma viride*) даже колонизировали гофрированный слой картона. Данные грибы использовали в качестве объектов исследования процессов биосорбции тяжелых металлов. Все культуры хорошо росли при низкой активности воды (aw= 0,85) в температурном диапазоне от 5 до 28оС, проявляли высокую целлюлазную активность в чашечной культуре на среде с КМЦ в качестве источника углерода и индикатором конго-красный.

Известно, что на протекание процессов биосорбции влияет целый ряд факторов: структура клеточной стенки, pH раствора, тип иона, концентрация, молекулярная масса, заряд и т.п. В живом мицелии работают два различных механизма: физико-химические процессы сорбции металлов биополимерами клеточной стенки и их энергозависимое внутриклеточное связывание; в нежизнеспособной биомассе наблюдается только сорбция поверхностными структурами [2].

Чтобы изучить сорбционную активность живого мицелия, в качестве сорбата использовали низкие концентрации ионов металлов (0,01 мг-экв/л). Длительность контакта сорбента с сорбатом составляла 1 час, при этом состояние динамического равновесия наступало уже через 30 минут, а наиболее интенсивно процесс связывания происходил первые 10 минут.

Максимальное количество металлов поглощалось грибной биомассой при pH 6,0, температурный оптимум сорбции 15 – 20 С.

Одной из важнейших характеристик сорбентов является их сорбционная емкость. Было выявлено, что в наибольшем количестве грибной мицелий связывает ионы свинца (10 – 12 мг на 1 г биомассы), накопление других металлов было в 2 – 3 раза ниже (рисунок 1).

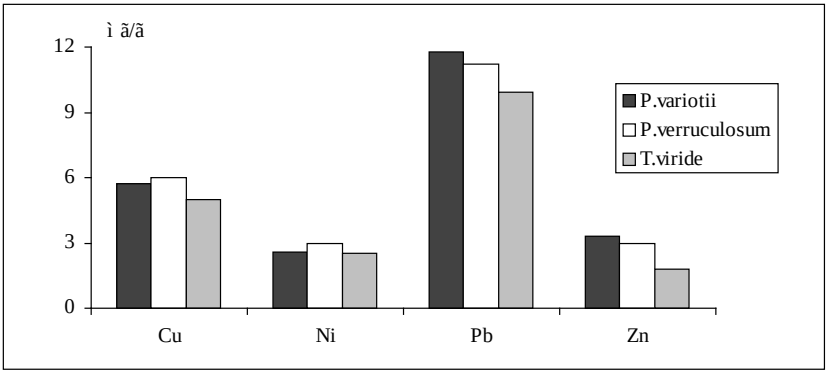


Рис. 1. Сорбционная емкость (мг/г) мицелия антарктических штаммов *P. variotii*, *P. verrucosum* и *T. viride* по отношению к катионам тяжелых металлов в концентрации 0,01 мг-экв/л

В процессе ионного обмена биосорбентам присуща избирательность вследствие того, что сорбирующая способность зависит как от числа функциональных групп, способных вступать во взаимодействие с ионами металлов, так и от свойств самих катионов. Пересчет сорбционной емкости из мг/г на статическую обменную емкость в мг-экв/г показал, что активнее всего данные изоляты связывают не свинец, а медь, ряд предпочтительности сорбции имел следующий вид: Cu2+>Pb2+> Zn2+> Ni2+ (рисунок 2).

Закономерности, характеризующие селективность извлечения тяжелых металлов, аналогичным образом проявляются как в смесях, так и в однокомпонентных эквимолярных растворах. В смешанных растворах наблюдается предпочтительное связывание тех ионов металлов, по отношению к которым сорбент имеет более высокую сорбционную емкость в индивидуальных растворах соответствующих солей. Для характеристики поглотительной способности сорбентов и их селективности широко используется коэффициент распределения – Kd, характеризующий соотношение концентраций вещества в жидкой и твердой фазе.

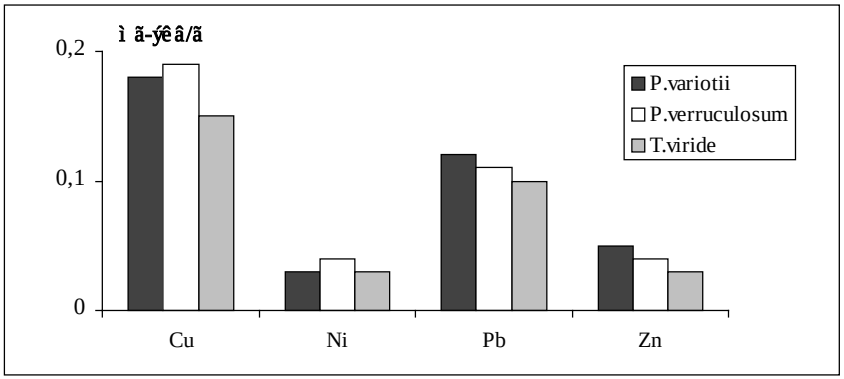


Рис. 2. Статическая обменная емкость (мг-экв/г) мицелия антарктических штаммов *P. variotii*, *P. verrucosum* и *T. viride* по отношению к катионам тяжелых металлов в концентрации 0,01 мг-экв/л.

В растворах, содержащих 5 – 10 мг металла грибы проявили максимальную способность к их аккумулированию, коэффициенты распределения в системах катионы металлов – биомасса колебались в диапазоне от 72 до 1214 мл/г (таблица 1).

Таблица 1. Коэффициенты распределения в системах мицелий – ионы тяжелых металлов (исходная концентрация металлов 10 мг/л).

Гриб	Kd, мл/г			
	Cu	Ni	Pb	Zn
P. variotii	1125	219	1089	324
P. verrucosum	1214	182	860	244
T. viride	935	123	706	72

Результаты исследования показали, что даже при низком содержании ионов тяжелых металлов плесневые грибы могут накапливать их в больших количествах. Находящиеся в воздухе споры и фрагменты мицелия, насыщенные токсичными металлами, могут представлять серьезную угрозу здоровью полярников. Исключить присутствие плесневых грибов на полярных станциях невозможно, но минимизировать негативные последствия их жизнедеятельности вполне реально.

Список литературы

1. Mertoglu-Elmas G. The effect of colorants on the content of heavy

metals in recycled corrugated board papers // BioResurces. – 2017.– V. 12, N 2 – P. 2690 – 2698.
2. Скугорева С.Г., Кантор Г.Я., Домрачева Л.И. Биосорбция тяжёлых металлов микромицетами: особенности процесса, механизмы, кинетика // Теоретическая и прикладная экология. – 2019. – № 2. – С.14 – 31.
3. Гончарова И.А., Тригубович А.М., Арашкова А.А. и др. Микологический анализ пылевидных налетов внутри строений в Антарктиде // Природная среда Антарктики: междисциплинарные подходы к изучению: сб. материалов IV международной научно-практ. конференции, Домжерицы, 21-23 сентября 2022 г. – Минск: БГТУ, 2022. – С. 86-89.

МИКРОБИОТА СМАЗОЧНО-ОХЛАЖДАЮЩИХ ЖИДКОСТЕЙ

Козырева А. М., Еланский С. Н., Кокаева Л. Ю.
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Смазочно-охлаждающие жидкости (СОЖ) широко используются при обработке металлических изделий для уменьшения трения и нагревания. После периода эксплуатации (от нескольких недель до нескольких месяцев) СОЖ разрушаются из-за нагревания и развития в них микроорганизмов. Утилизация отработанных СОЖ – глобальная проблема, так как жидкость токсична. СОЖ имеют сложный состав: кроме масла (как правило, нефтяного происхождения) в состав эмульсии входят многочисленные присадки: биоциды для предотвращения роста в СОЖ микроорганизмов, антикоррозионные присадки, поверхностно-активные вещества, пеногасители и др. Мировой объём использованных СОЖ огромен – более двух миллионов м3 в год [1].

Применение грибов и бактерий, разрушающих СОЖ, является перспективной технологией для её утилизации. Утилизация при помощи микроорганизмов имеет преимущества перед традиционными физико-химическими способами утилизации. Например, отпадает надобность в химических реагентах, которые разрушают СОЖ, так как эту роль берут на себя микроорганизмы. Метод требует меньше энергии, экологически безопасен и конкурентоспособен по стоимости [1]. Несмотря на то, что грибы развиваются в СОЖ не менее активно, чем бактерии, практически нет работ по созданию препаратов на основе грибов для биологической утилизации. Поэтому изучение таких грибов – актуальная задача для разработки биопрепаратов и, таким образом, сохранения окружающей среды.

Целью данного исследования было выявить микроорганизмы, в том числе грибы, которые наиболее эффективно разрушают СОЖ, чтобы в дальнейшем использовать их для утилизации технической жидкости. Задачи проекта были следующими: выделить из отработанной СОЖ разнообразные бактерии

и грибы, определить их видовую принадлежность и оценить, насколько интенсивно они растут в СОЖ.

В ходе исследования из отработанной эмульсионной СОЖ удалось выделить и определить 8 таксонов грибов и 5 таксонов бактерий. Анализ последовательностей ДНК выявил грибы-аксомицеты *Aspergillus sp.*, *Penicillium copticola*, *Penicillium echinulatum*, *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum* и *Fusarium solani*. Были выделены также ксилотрофные базидиомицеты *Oxyporus corticola* и Schizophyllum commune. Представители бактерий оказались следующими: *Arthrobacter sp.*, *Bacillus velezensis*, *Pseudarthrobacter sp.*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas sp.*

Согласно литературным данным, бактерии из рода *Pseudomonas* и грибы *Fusarium*, *Penicillium* и *Aspergillus* регулярно встречаются в СОЖ [2]. Также показано, что бактерия *Pseudomonas oleovorans* способна окислять C5-C12 н-алканы благодаря двум регионам на OCT-плазмиде [3]. Эта способность может служить ей для питания углеводородами нефтяного происхождения, содержащимися в СОЖ. Грибы *Fusarium oxysporum* и *Fusarium solani* способны интенсивно расти в СОЖ и выдерживать рекомендованные производителем концентрации биоцида Vazin-50, добавляемого в СОЖ для защиты от биодеструкции [4]. Таким образом, выделенные микроорганизмы перспективны для утилизации СОЖ. Согласно нашему анализу литературных данных, ранее *Oxyporus corticola* и Schizophyllum commune из СОЖ не выделялись.

Выделенные из СОЖ микроорганизмы проверили на интенсивность роста в свежей эмульсионной СОЖ. Также проверяли на интенсивность роста в СОЖ грибы, выделенные ранее из авиационного топлива. Для этого грибы и бактерии выращивали в чашке Петри, наполненной технической жидкостью. Эффективность роста грибов оценивали визуально (по шкале интенсивный рост – слабый рост – отсутствие роста). Эффективность роста бактерий оценивали путем сравнения концентрации КОЕ (колониеобразующих единиц) в СОЖ в начале и в конце эксперимента. Результаты эксперимента по оценке интенсивности роста грибов представлены в таблице 1.

Интенсивный рост в СОЖ показали грибы рода *Fusarium*, что согласуется с литературными данными. Также интенсивный рост показал древоразрушающий базидиомицет *Oxyporus corticola*. Этот гриб относится к возбудителям белой гнили – грибам, разрушающим лигнин. Лигнин является ароматическим гетерополимером. Поэтому можно предполагать, что *Oxyporus* имеет ферменты для разрушения ароматических компонентов нефти, входящих в состав СОЖ. Похожие данные имеются и в литературе. Согласно работе Adenipekun с соавтрами, Вешенка лёгочная (*Pleurotus pulmonarius*), вызывающая белую гниль, может значительно снижать содержание нефтяных углеводородов в почве, загрязненной СОЖ [5]. Грибы, относящиеся к родам

Penicillium, *Talaromyces* и *Aspergillus*, показали слабый рост в СОЖ. Результаты эксперимента оценке интенсивности роста бактерий представлены в таблице 2.

Таблица 1. Интенсивность роста грибов в СОЖ.

Название гриба	**Интенсивность роста в СОЖ**
Fusarium oxysporum	Интенсивный рост
Fusarium solani	Интенсивный рост
Fusarium sp.	Интенсивный рост
Oxyporus corticola	Интенсивный рост
Penicillium echinulatum	Слабый рост
Penicillium copticola	Слабый рост
Aspergillus sp.	Слабый рост
*Talaromyces rugulosus**	Слабый рост
*Talaromyces amestolkiae**	Слабый рост
*Penicillium chrysogenum**	Слабый рост

* – грибы, выделенные ранее из авиационного топлива

Таблица 2. Интенсивность роста бактерий в СОЖ.

Название бактерии	Увеличение концентрации КОЕ, раз
Pseudomonas oleovorans 1	1 000 000
Pseudomonas oleovorans 2	653 333
Pseudarthrobacter sp.	41 538
Bacillus velezensis	59

Среди бактерий наибольшее увеличение концентрации КОЕ при росте в СОЖ показала бактерия *Pseudomonas oleovorans*, что ещё раз подтверждает ее эффективность в переработке технической жидкости.

Подводя итог, в ходе исследования из отработанной СОЖ были выделены и идентифицированы микроорганизмы, интенсивно развивающиеся в этой технической жидкости. К ним относятся бактерия *Pseudomonas oleovorans*, грибы *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp.*, а также *Oxyporus corticola*, выделенный из СОЖ впервые. Они перспективны для дальнейшего изучения и разработки биологического метода утилизации СОЖ.

Список литературы

1. Kaszycki P., Petryszak P., Supel P. Bioremediation of a spent metalworking fluid with auto-and allochthonous bacterial consortia // Ecological Chemistry and

Engineering. – 2015. – Т. 22. – №. 2. – С. 285-299.

2. Saha R., Donofrio R. The microbiology of metalworking fluids // Applied microbiology and biotechnology. – 2012. – Т. 94. – С.1119-1130.

3. Van Beilen J. B., Wubbolts *M. G.*, Witholt B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans* // Biodegradation. – 1994. – Т. 5. – С. 161-174.

4. Sandzhieva D. A., Chudinova E. M., Elansky A. S., Elansky S. N., Udovichenko A. N., Burova A. *A. et* al. Development of a Rapid Method for Monitoring Biodeterioration of Petroleum Products and Technical Fluids. Part I // Petroleum Chemistry. – 2021. – Т. 61. – №. 1. – С. 107-113.

5. Adenipekun C. O., Ipeaiyeda A. R., Olayonwa A. J. Bioremediation of soil contaminated with spent and fresh cutting fluids by *Pleurotus pulmonarius* (Fries) Quelet // African Journal of Biotechnology. – 2013. – Т. 12. – №. 42. – С. 6091-6097.

МИКОЭКОЛОГИЯ НЕПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ГОРОДА НИЖНЕГО НОВГОРОДА

Кряжев Д.В.
НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород

Развитие индустриальной деятельности закономерно приводит к деформации экосистемы обитания человека, неизбежной в ходе прогресса цивилизации. Сейчас во всем мире происходит трансформация почвенного микробиоценоза в направлении преобладания микроскопических грибов над бактериями в результате загрязнения земли органическими выбросами и нефтепродуктами. В настоящее время микроскопические грибы являются обязательным компонентом пыли как уличной, так и домашней. [1]. Контакт жителей современных городов с микроскопическими плесневыми грибами (микромицетами) происходит постоянно. В настоящее время особенно остро стоит проблема изучения микобиоты различных помещений, прежде всего непроизводственных, в которых городское население проводит значительную часть времени [2]. Закономерности распространения сапротрофных микромицетов в антропогенных биотопах привлекают все большее внимание, в связи с постоянным их присутствием в среде обитания человека, в том числе и в воздухе помещений [3]. Жизнедеятельность микромицетов в городской среде сопровождается воздействием на человека опасных биологических факторов, в основе которых лежит резидентное заселение помещений грибными ассоциациями. В таких случаях может иметь место формирование резервуаров возбудителей – источников инфекций по типу «сапронозов», а также появляться предпосылки и условия для возникновения у жителей сенсибилизации и аллергических реакций [4]. По оценкам экспертов ВОЗ, городской житель проводит в помещениях в среднем 80% своего времени. При

этом он может испытать неблагоприятное воздействие самого здания, если оно контаминировано представителями условно-патогенной микофлоры [5].

Цель исследования – определение видового и количественного состава микобиоты внутренней воздушной среды в непроизводственных помещениях Нижнего Новгорода как с признаками биоповреждений, так и без оных.

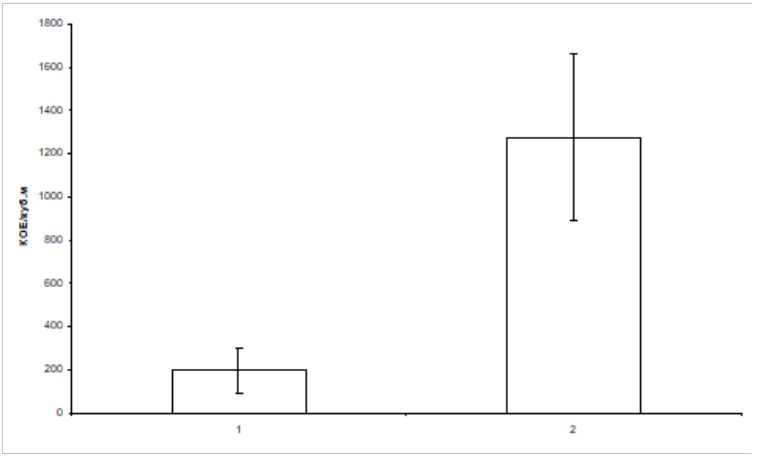
Материалы и методы. Посев воздуха осуществляли с помощью импакторного пробоотборника ПУ-1Б на пластинки агара Чапека-Докса в стерильные чашки Петри, в режиме 100 л/мин. Чашки Петри инкубировали в термостате при температуре 28±2°С. В лабораторных условиях подсчитывали количество жизнеспособных пропагул микромицетов в пробах и вычисляли содержание колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1м3 воздуха. Видовую идентификацию микромицетов проводили классическим бактериологическим методом. Для интерпретации данных по содержанию спор микромицетов в воздухе использовали Европейскую классификацию (проект ECA COST 613 19930) [6] и классификацию уровней микогенной контаминации воздуха для жилых помещений в США (по данным Американского Национального Аллергологического Бюро) [7].

Результаты и обсуждение. В объекты исследований входили: лаборатории и учебные аудитории высших учебных заведений, офисные помещения, расположенные в кирпичных и панельных домах различных (до 10, от 10 до 20) лет постройки, административные помещения, складские помещения, помещения культовых сооружений и др. Была обследована воздушная среда помещений без видимых признаков микогенной контаминации (отсутствие участков плесневого поражения на строительных и отделочных материалах). Всего было обследовано 40 помещений. Ни в одном из обследованных помещений не наблюдалось превышения пороговой концентрации спор микромицетов в воздухе установленной ВОЗ (500 КОЕ/м3). При сопоставлении полученных результатов со значениями, представленными в существующих классификациях, было показано следующее: по классификации Американского Национального Аллергологического Бюро все обследованные помещения характеризовались низким уровнем контаминации воздушной среды; согласно Европейской классификации 8 помещений (20,0 %) характеризовались очень низким уровнем микогенной контаминации, 17 (42,5 %) низким уровнем микогенной контаминации, 15 (37,5 %) – средним уровнем микогенной контаминации воздуха. Таксономическая структура выявленной микобиоты была представлена 32 видами, среди.

Исследовался качественный и количественный состав микобиоты воздуха 33 непроизводственных помещений с визуальными признаками плесневого поражения (повреждение поверхности отделочного материала, окрасочного слоя, обоев или иного покрытия). При этом в 25 обследованных помещениях (75,8 %) наблюдалось превышение пороговой концентрации

спор микромицетов в воздухе, установленной ВОЗ, которое варьировало в достаточно широких пределах от 1,28 до 6,97 раз. При сопоставлении полученных результатов со значениями, представленными в существующих классификациях, было показано следующее: часто те помещения, которые по классификации Американского Национального Аллергологического Бюро характеризовались средним уровнем контаминации воздушной среды, согласно Европейской классификации получали высокую оценку уровня микогенной контаминации воздуха. Таксономическая структура выявленной микобиоты была представлена 49 видами.

В ходе исследования проводился сравнительный анализ уровня грибковой обсемененности воздуха в помещениях без визуальных признаков микогенной контаминации и с видимыми участками плесневого поражения. Выявлена взаимосвязь между наличием участков плесневого поражения и концентрацией микромицетов в воздухе помещений. В помещениях с визуальными признаками плесневого поражения концентрация грибов колебалась от 137 до 3483 КОЕ/м3 и была достоверно выше ($p<0,05$), чем в помещениях без визуальных признаков плесневого поражения (рис. 1).



1 – помещения без участков микогенной контаминации
2 – помещения с участками микогенной контаминации

Рис. 1. Средний уровень микогенной контаминации воздушной среды обследованных помещений.

В помещениях без визуальных признаков плесневого поражения концентрация микромицетов в воздухе колебалась от 22 до 492 КОЕ/м3. Выявлено, что существенных различий по качественному составу микобиоты воздуха в помещениях с визуальными признаками плесневого поражения

и в помещениях без визуальных признаков плесневого поражения не было. Основными микромицетами-контаминантами воздуха были *Penicillium spp.* (44 % и 22 % соответственно) и *Aspergillus spp.* (38 % и 20 % соответственно). В помещениях, пораженных плесневыми микромицетами, достоверно чаще выявляли представителей родов *Alternaria spp.* и *Trichoderma spp.* ($p<0,05$). Следует также указать, что выявление представителей вышеуказанных родов микромицетов в воздухе коррелировало с результатами обследования в помещениях участков микогенной контаминации строительных и отделочных материалов (рис 2). Согласно коэффициенту ранговой корреляции Спирмена между встречаемостью микромицетов на участках микогенной контаминации и их присутствием в воздушной среде существует высокая прямая корреляция ($r = 0,81$ при $p < 0,005$). Также следует отметить, что никаких статистически значимых сезонных колебаний в уровне микогенной контаминации обследованных помещений выявлено не было.

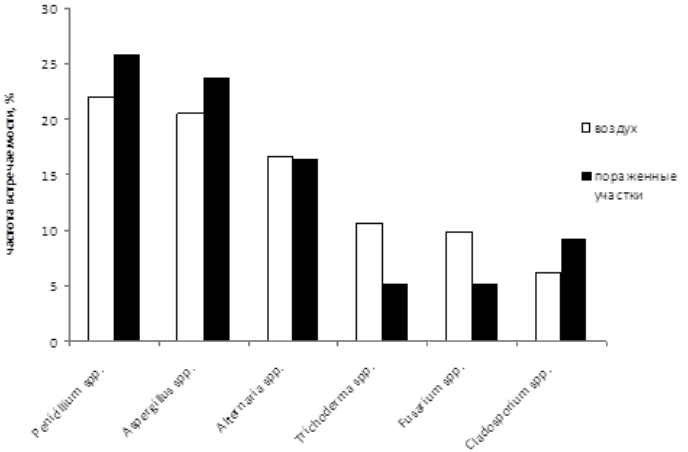


Рис. 2. Частота встречаемости микромицетов в воздухе обследованных помещений и на участках микогенной контаминации в них

Заключение. В воздухе непроизводственных помещений Нижнего Новгорода обособленно формируется микобиота с общим доминирующим комплексом микромицетов, состоящим из двух родов – *Aspergillus spp.* и *Penicillium spp.* При этом ни в одном из обследованных помещений без визуальных признаков микогенной контаминации концентрация микромицетов в воздухе не превышала условно-допустимую норму 500 КОЕ/м3. В 75,8 % помещений с визуальными признаками плесневого поражения концентрация микромицетов в воздухе превышала данную норму. Качественный состав микобиоты воздуха помещений современной

постройки с участками и без участков микогенной контаминации различается, – в помещениях, пораженных микромицетами, достоверно чаще выявляли представителей родов *Alternaria spp.* и *Trichoderma spp.* Микобиота воздуха помещений с плесневым поражением и участков микогенной контаминации в них качественно сходны, причем между встречаемостью микромицетов на участках микогенной контаминации и их присутствием в воздушной среде есть высокая прямая корреляция, что может сказаться на составе микоценоза носоглотки людей, пребывающих в этом помещении длительное время. При отсутствии на текущий момент на федеральном уровне гигиенического норматива, устанавливающего максимально допустимый уровень содержания плесневых грибов в воздухе помещений, целесообразно использовать Европейские нормы контаминации клетками грибов воздуха помещений как наиболее оптимальные. Контроль над уровнем грибковой обсемененности непроизводственных помещений, безусловно, является одним из средств обеспечения биологической безопасности среды обитания человека.

Список литературы

1. Черныш Е.О., Романенко Л.И., Березовчук С.П., Олийник З.А. Гигиеническая оценка микологического загрязнения воздуха жилых и общественных помещений. Сб. мат. юб. науч.-практ. конф. с международ. уч. Минск: Изд-во БГУ. 2019. С. 760-765.

2. Антонов В.Б., Медведева Т.В. Все о грибковых болезнях человека. Популярная медицинская микология. СПб.: «Диалект». 2015. 252 с.

3. Лугаускас А., Яскелявичюс Б. Микологическое состояние жилых помещений Вильнюса. Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. Вып. 3. С. 207-215.

4. Новикова Н.Д. Микробное сообщество среды обитания пилотируемых орбитальных комплексов – проблемы, методы контроля и коррекции: Автореф. дис. докт. биол. наук: 14.00.32. Н.Д. Новикова. Москва, 2002. 50 с.

5. Антонов В.Б. Нозокомиальная микотическая инфекция – оптимизация профилактики, диагностики и лечения. Успехи медицинской микологии. 2017. С. 278-282.

6. Желтикова Т.М. К вопросу о допустимом уровне микромицетов в воздухе помещений // Проблемы медицинской микологии. 2009. Т.11. № 2. С. 41–43.

7. Петрова-Никитина А.Д., Мокеева В.Л., Желтикова Т.М. Микобиота домашней пыли г. Москвы // Микология и фитопатология, 2000. Т.34, вып.3. С. 25–33.

ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПЛОДОВЫХ ТЕЛ МАКРОМИЦЕТОВ ПРИ АЭРОТЕХНОГЕННОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ

Лянгузова И.В.
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

В настоящее время широкое распространение получила концепция экосистемных услуг, включающая в себя социально-экономические и природоохранные цели. Лесные экосистемы предоставляют целый комплекс экосистемных услуг, можно перечислить лишь некоторые из них: 1) производство древесины, пиломатериалов, целлюлозы и бумаги и др.; 2) недревесные ресурсы леса (съедобные растения, ягоды, грибы, лекарственные растения); 3) среда обитания (поддержание плодородия почв, предоставление среды обитания для других организмов); 4) регулирование климатических факторов; 5) культурные услуги (отдых и экологический туризм).

Бореальные леса с последней трети XX века подвергаются мощному воздействию газообразных и твердых поллютантов, что уже привело к усыханию хвойных лесов в Европе. Особое внимание и бережное отношение необходимы хвойным лесам северной тайги, произрастающим в суровых климатических условиях, что делает их наиболее уязвимыми и ранимыми к стрессовым факторам, одним из которых является техногенное загрязнение. Мурманская область, занимающая практически полностью Кольский полуостров, – один из наиболее индустриально развитых регионов России, на ее территории расположены крупные предприятия цветной и черной металлургии, минеральных удобрений и строительных материалов, лесной, деревообрабатывающей и рыбной промышленности. Комбинат "Североникель" всегда был одним из ведущих предприятий никелевой промышленности СССР и России, занимает ведущие позиции в мировом производстве никеля. Тяжелые металлы, входящие в состав полиметаллической пыли, выбрасываемой в атмосферу промышленными предприятиями, относятся к наиболее опасным и токсичным загрязняющим веществам окружающей среды.

Цель – экотоксикологическая оценка качества съедобных грибов, произрастающих под воздействием аэротехногенного загрязнения на основе определения содержания ряда тяжелых металлов в плодовых телах макромицетов.

Объектами исследования были плодовые тела следующих видов базидомицетов: подосиновик *Leccinum versipelle* (Fr.) Snell, подберезовик *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray, моховик *Suillus luteus* (L.) Roussel, сыроежка р. *Russula* Pers. и горькушка *Lactarius rufus* (Scop.) Fr. Сбор грибов проводили в июле-августе2021 г. в местах, наиболее активно посещаемых населением, и

расположенных в зонах (буферной и импактной) влияния аэротехногенных выбросов комбината «Североникель» (г. Мончегорск). Одновременно со сбором образцов грибов отбирали пробы органогенного горизонта (лесная подстилка) Al-Fe-гумусовых подзолов для оценки современного уровня загрязнения местообитаний тяжелыми металлами. Химический анализ кислотной вытяжки (1.0 н HCl) из органогенного горизонта подзолов и образцов плодовых тел грибов проводили методом атомно-абсорбционной спектрометрии [1]. В исследуемых образцах определяли содержание Ni, Cu, Co, Pb, Cd в 3-кратной повторности. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ Statistica 64.

В фоновых районах Кольского полуострова содержание кислоторастворимых форм Ni и Cu в верхнем органогенном горизонте Al-Fe-гумусовых подзолов составляет в среднем 10 мг/кг для каждого металла, а валовые концентрации тяжелых металлов на территории Мурманской обл. в целом не превышают ОДК для почв, которые приведены в таблице. В пунктах почвенного обследования на территории буферной зоны, расположенной в 30 км от комбината «Североникель», превышение ОДК по Ni и Cu составляет немногим более 7 крат, содержание Co, Pb и Cd не превышает ОДК. На территории импактной зоны в 10–15 км от комбината содержание всех исследуемых тяжелых металлов превышает ОДК (таблица), причем наиболее значительных величин превышение достигает для Ni (53 раза) и Cu (57 раз), а для Pb и Cd отмечается лишь 1.5-кратное превышение. Это свидетельствует об очень высокой степени фитотоксичности почв в радиусе 20–30 км от комбината «Североникель» и представляет угрозу для экологической безопасности недревесных ресурсов леса, в том числе съедобных грибов.

Дисперсионный анализ данных выявил достоверные различия в содержании всех исследуемых металлов в различных видах съедобных грибов, как на территории буферной, так и импактной зон. Выявлена видовая специфичность в накоплении тяжелых металлов в плодовых телах базидомицетов. Так, например, максимальное содержание Cd обнаружено в *Leccinum scabrum*, Cu – в *Suillus luteus*, Ni – *Russula spp.*, Co и Pb – в *Lactarius rufus* (таблица).

Сравнительный анализ данных о транслокации тяжелых металлов из лесной подстилки в плодовые тела базидомицетов показывает, коэффициент биологического накопления (КБН) не превышает 20% как в буферной, так и в импактной зонах (рисунок), за исключением Cd, для которого КБН составляет 175–280%.

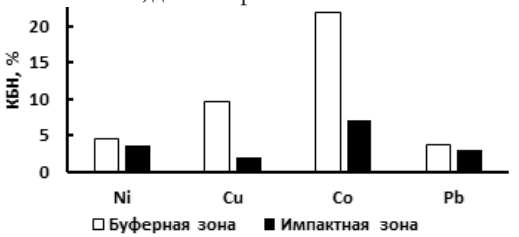


Рисунок 1. Средние значения коэффициентов (%) биологического накопления

(КБН) в плодовых телах исследуемых видов базидомицетов.

Таблица 1. Среднее содержание (мг/кг абс. сух. в-ва) тяжелых металлов в плодовых телах исследуемых видов базидомицетов и в лесной подстилке в пределах буферной и импактной зон.

Вид грибов	Ni	Cu	Co	Pb	Cd
	Буферная зона				
Leccinum versipelle	4.7±0.2	48.2±0.4	0.42±0.01	0.76±0.01	0.20±0.03
Leccinum scabrum	5.0±0.1	11.8±1.3	0.41±0.01	1.17±0.05	2.11±0.42
Suillus luteus	5.2±0.6	38.4±0.2	1.06±0.07	0.79±0.11	0.27±0.01
Russula spp.	8.1±0.1	10.9±0.9	0.96±0.01	1.04±0.02	0.21±0.04
Lactarius rufus	9.2±0.2	7.7±0.9	1.42±0.05	1.43±0.08	0.43±0.02
Лесная подстилка	144±6	244±10	3.8±0.1	27±0.4	0.23±0.02
	Импактная зона				
Leccinum versipelle	–	–	–	–	–
Leccinum scabrum	11.1±0.2	15.4±1.6	0.53±0.07	0.93±0.04	3.39±0.41
Suillus luteus	21.6±0.8	51.2±1.6	1.18±0.04	0.86±0.03	0.96±0.11
Russula spp.	80.4±1.2	48.9±6.0	2.3±0.14	1.47±0.36	0.43±0.06
Lactarius rufus	43.5±1.4	32.2±4.2	4.35±0.2	2.59±0.13	0.89±0.04
Лесная подстилка	1064±67	1865±87	28.9±1.4	47±4	0.81±0.05
ПДК*	0.5	5.0	–	0.5	0.1
ОДК**	20	33	5.0	32	0.5

Однако несмотря на невысокие значения КБН уровень накопления тяжелых металлов в плодовых телах грибов очень значительно превышает их ПДК (таблица). Для Ni это превышение достигает 160 крат, для Cu – 10 крат, для Pb – 5 крат, для Cd – 34 крат. Столь высокий уровень накопления тяжелых металлов в плодовых телах базидомицетов свидетельствует о непригодности использования исследуемых видов грибов в пищу.

Таким образом, результаты исследования показывают, что территория буферной зоны и, особенно импактной зоны, очень сильно загрязнена полиметаллической пылью, выбрасываемой в атмосферу комбинатом «Североникель», что привело к высокому и очень высокому уровню

фитотоксичности верхнего органогенного горизонта Al-Fe-гумусовых подзолов. Проведенная экотоксикологическая оценка качества съедобных грибов выявила их непригодность для употребления в пищу местным населением, по крайней мере в радиусе 30 км от комбината «Североникель», где не рекомендуется сбор грибов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РНФ (проект №23-26-00193). Автор благодарит за помощь при проведении химических анализов Беляеву А.И., Казанцеву А.А.

Список литературы

1. Методы изучения лесных сообществ. СПб.: НИИХимии СПбГУ, 2002. С. 240.

2. Сан П и Н 42-123-4089-86. Предельно допустимые концентрации тяжелых металлов и мышьяка в продовольственном сырье и пищевых продуктах. М., 1986. 11 с.

3. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. М., 2001. 180 с.

4. ГН 2.1.7.2511-09. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве. Гигиенические нормативы. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.— 10 с.

УТИЛИЗАЦИЯ МЕДИЦИНСКИХ МАСОК МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ПОЧВЕННЫМИ ГРИБАМИ

Матевосян Р.Э., Шахазизян И.В., Маркарян Л.В., Петросян А.М., Нанагюлян С.Г.

Ереванский государственный университет, Армения

В настоящее время во всех сферах человеческой деятельности используется огромное количество полимерных материалов различного происхождения. Из-за довольно большой стабильности накопление полимерных материалов и их отходов является большой природоохранной проблемой и может привести к необратимым последствиям. В связи с этим, весьма актуально изучение и выявление факторов, способствующих быстрому биоразложению различного рода полимерных материалов.

Вспышка COVID-19 в 2020-2022гг. и всеобщее применение масок в период пандемии, сделало целесообразным изучение процесса биодеструкции наиболее часто используемых масок (медицинские, респираторные), накопление которых становится

большой экологической проблемой.

Материалом для наших исследований являлись образцы техногенно загрязненных почв, а также медицинские маски и респираторы (защитная маска-респиратор KN95 и многоразовая маска-респиратор 3M). Биодеструкция полимерных материалов оценивалась согласно ГОСТ 9.049-91 (ЕСЗКС) «Единая система защиты от коррозии и старения» [1]. Методом разведения почвенной суспензии нами были выделены виды микроскопических грибов, которые использовались в приготовлении водно-споровых суспензий для исследования процесса биодеструкции масок.

Первый этап работы заключался в выделении из природной среды методом разведения почвенной суспензии так называемых «диких» штаммов микроорганизмов, способных участвовать в деструктивных процессах различных полимерных композиций [2]. Идентификация выделенных микроскопических грибов проводилась на основе культурально-морфологических признаков с использованием стандартных определителей [3; 4; 5]. Названия видов грибов приводятся по номенклатуре базы данных Mycobank [6].

Следующим этапом явилось исследование биодеструкции масок методом опрыскивания водно-споровой суспензией. Суспензия с концентрацией спор грибов каждого вида 1-2 млн/см3, готовилась непосредственно перед испытанием с использованием дистиллированной воды. В соответствии с ГОСТ 9.048-89 поверхности образцов заражались водно-споровой суспензией грибов равномерным опрыскиванием [7]. Испытания проводились при температуре (24±2)0С и относительной влажности воздуха более 90%. Продолжительность испытаний при оценке грибостойкости материалов по степени развития грибов составляло 28 суток с промежуточным осмотром через каждые 7 дней. Опыт проводился в трех повторностях, исследуемые образцы помещались в чашки Петри с питательной средой и без среды

В результате микологического исследования из почв были выделены 17 видов микромицетов, относящихся к 8 родам, 6 семействам, 5 порядкам, 4 классам и 2 подотделам и 2 отделам (табл. 1). В водно-споровую суспензию были включены виды грибов *Penicillium canescens*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Fusarium remitectum*, *Cladosporium herbarum*, *Rhyzopus stolonifer*, которые известны как активные агенты биоразрушения полимерных материалов.

Таблица 1. Таксономический анализ микроскопических грибов выявленных из почвы.

Отдел /Подотдел	Класс	Порядок	Семейство	Род	Вид
Mucoromycota/ Mucoromycotina	Mucoromycetes	Mucorales	Mucoraceae	Mucor	*M. heterosporus* A. Fischer
				Rhizopus	*R. microspores* Tiegh.
					R. stolonifer (Ehrenb.) Vuill.
Ascomycota/ Pezizomycotina	Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae	Aspergillus	*A. niger* Tiegh.
					A. versicolor (Vuill.) Tirab.
					A. restrictus G. Sm.
					A. ochraceus K. Wilh.
					A. wentii Wehmer
				Penicillium	*P. adametzii* K.W. Zaleski
					P. canescens Sopp
					P. lanosum Westling
			Trichocomaceae	Talaromyces	*T. duclauxii* (Delacr.)
	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	*F. concolor* Reinking
					F. incarnatum (Roberge ex Desm.) Sacc.
	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	*A. alternata* (Fr.) Keissl.
		Capnodiales	Cladosporiaceae	Cladosporium	*C. lignicola* Corda
					C. herbarum (Pers.) Link
2/2	4	5	6	8	*17*

На 28-й день эксперимента во всех чашках Петри с питательной средой отмечен интенсивный рост микроскопических грибов. Образец 3М был полностью покрыт мицелием микромицетов, что свидетельствует о начале процесса биоповреждения. В чашках Петри с образцами KN95 и медицинской маской зарегистрировано наличие незначительных колоний микроскопических грибов. На образцах в чашках Петри без питательной среды отчетливо видны колонии микроскопических грибов (рис. 1, 2, 3).

Как утверждают некоторые авторы, в загрязненной среде и экстремальных условиях структура конидальной системы грибов часто видоизменяется [8]. В процессе исследований нам не удалось идентифицировать выделенный с масок гриб из рода *Penicillium*, так как у штамма отмечались микроморфологические изменения мицелия и конидиального аппарата, что затруднил определение вида. В период роста на исследуемых субстратах конидии этого гриба подверглись серьезным изменениям, что возможно носило адаптивный характер.

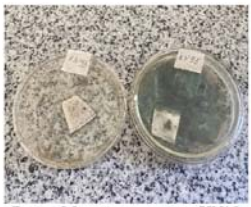


Рис. 1. Маска-респиратор KN95

Рис. 2. Медицинская маска

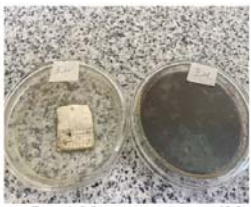


Рис. 3. Маска-респиратор 3М

Как видно из таблицы 2, в результате микологических исследований, на масках обнаружены следующие виды микромицетов - *Mucor heterosporus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.*, *Alternaria alternata*. Следует отметить, что рост микромицетов наблюдался как на питательной среде, так и непосредственно на исследуемом материале.

Таблица 2. Виды микромицетов-деструкторов на исследуемых образцах масок.

Маски	Чашках Петри с питательной средой	Чашки Петри без питательной среды
Медицинская маска	*Penicillium sp.*	*Alternaria alternata*
	Aspergillus niger	
	Alternaria alternata	
Защитная **маска-респиратор KN95**	*Penicillium sp.*	*Aspergillus niger*
	Aspergillus niger	
	Mucor heterosporus **A. Fisch.**	*Mucor heterosporus*
Многоразовый респиратор 3М	*Penicillium sp.*	*Penicillium sp.*
	Aspergillus niger	
	Alternaria alternata	*Aspergillus niger*
	Mucor heterosporus	

На 28-й день эксперимента виды *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium sporotrichioides* и *Cladosporium herbarum*, которые входили в состав водно-споровой суспензии, не проросли. Наряду с этим был отмечен рост вида *Mucor heterosporus*, который не входил в состав водно-спорового комплекса.

Что касается оценки грибостойкости образцов, на данном этапе из 3-х исследуемых масок образец 3 М можно оценить в 5 баллов, как максимально грибостойкий, а образцы медицинской маски и KN95 - в 4 балла. Следует отметить, что некоторые виды грибов к концу эксперимента начали проявлять биоразлагающую активность, и возможно в дальнейшем грибостойкость образцов понизится. Учитывая благоприятные условия для роста и развития грибов, в чашках Петри с питательной средой заражение образцов и биодеструктивная активность микромицетов проявляется быстрее.

Таким образом, повреждение образцов грибами и их последующее разложение - длительный процесс. Результаты опыта свидетельствуют о том, что исследуемые образцы являются подходящим субстратом для роста и развития грибов. Следовательно, биоразложение грибами возможно, но требует значительного периода времени, который зависит от экологических условий и антропогенного воздействия, способствующих росту грибов.

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке Комитета

по науке МОНКС РА в рамках научного проекта № 21T-1F281.

Список литературы

1. ГОСТ 9.049-91. Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов: государственный стандарт Союза ССР // Комитет стандартизации и метрологии СССР.–М., 1991.–16 с.
2. Matevosyan R.E., Nanagulyan S.G., Eloyan I.M., Yesayan T.A. Study of soil fungi in the territory of Kapan city and their surrounding // Proceedings of the YSU, Chemistry and Biology. – 2018. - 52 (3). - P. 193-167.
3. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов.- Л.: Наука, 1967.- 303с.
4. Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы.-Киев: Наукова думка,1988.
5. Коваль Э.З., Руденко А.В., Волощук Н.М. Пенициллии. Киев, 2016.
6. https://www.mycobank.org/. – 10.04.2023.
7. ГОСТ 9.048-89. Единая система защиты от коррозии и старения. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов: государственный стандарт Союза ССР // Государственный комитет СССР по стандартам. – М., 1989.
8. Кирцидели И.Ю. Микроскопические грибы в почвах и грунтах арктических горных систем / Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия – 2015, 16 с.

АНТРОПОГЕННЫЙ СТРЕСС КАК ФАКТОР ВОЗДЕЙСТВИЯ НА АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

Поляк Ю.М.
Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук

Деградационные изменения, происходящие в почве, и формирование ее токсических свойств в результате антропогенного воздействия, являются одной из наиболее серьезных экологических проблем нашего времени. В условиях постоянно возрастающей антропогенной нагрузки, в почвенных биоценозах происходит перестройка сложившихся в прошлом взаимосвязей между организмами. Изменения затрагивают не только структурные и функциональные особенности биоценоза, но и роль экзометаболитов во взаимоотношениях между организмами разных видов - аллелопатические взаимодействия. Феномен аллелопатии включает различные типы химических взаимодействий между

живыми организмами, которые происходят в результате выделения физиологически активных органических соединений [Гродзинский, 1991; Callaway et al, 2005]. Способность к образованию веществ, обладающих аллелопатическими свойствами, в том числе алкалоидов, глюкозидов, фенольных соединений, терпеноидов и др., сформировались у многих макро- и микроорганизмов в процессе сопряженной эволюции [Reigosa et al, 2006; Поляк, Сухаревич 2021].

Синтез аллелопатических соединений усиливается в условиях стресса, вызванного влиянием различных факторов окружающей среды, как природного происхождения (температура, влажность, недостаток питательных веществ), так и антропогенного (поступление в почву поллютантов) [Einhellig, 1995; Поляк, Сухаревич 2019]. При изучении аллелопатических взаимодействий, происходящих в почве, и прогнозировании их последствий, необходимо учитывать роль микроорганизмов в экологии почв. Среди представителей почвенной микробиоты, наиболее часто аллелопатической активностью обладают микромицеты – продуценты многих метаболитов с токсичными для человека, растений и животных свойствами.

Значение и вклад микромицетов-токсинообразователей в токсичность почвы определяется степенью развития и активности продуцентов. Стрессовые условия могут стимулировать образование токсинов микромицетами, кроме того, возможен рост численности токсигенных представителей почвенного микробного сообщества в условиях антропогенного воздействия [Киреева и др. 2003, Свистова и др. 2007]. При превышении антропогенной нагрузки, характерной для "зоны гомеостаза, может произойти изменение доли микромицетов в почвенных микрозонах от видов с узким спектром токсического действия к видам с широким спектром [Свистова и др. 2004]. В таких условиях, синтезируемые микромицетами токсины, могут накапливаться в заметных количествах и придавать почве токсические свойства.

Для оценки влияния антропогенных стрессоров на структурные и функциональные изменения почвенных биоценозов необходима качественная и количественная оценка взаимосвязей между компонентами биогеоценозов, анализ изменения видового разнообразия микробоценозов, изучение аллелопатических взаимодействий и определение критических концентраций биологически активных соединений, которые могут привести к необратимым нарушениям фундаментальных биологических процессов [Inderjit 2005; Cipollini et al. 2012]. Целью настоящей работы являлась изучение алеллопатических свойств микобиоты антропогенно-нарушенных почв северо-запада РФ и оценка влияния стресса на возникновение аллелопатических эффектов.

Стрессовое воздействие исследовали в условиях полевого эксперимента на примере загрязнения нефтью дерново-подзолистой суглинистой почвы, отличающейся благоприятными с агрохимической точки зрения свойствами: оптимальным гранулометрическим составом, близкой к нейтральной реакцией среды, высоким содержанием гумуса. Содержание нефтепродуктов в почве после внесения нефти составило 5,4%. В качестве критерия аллелопатической активности использовали показатель фитотоксичности комплекса почвенных микромицетов [Polyak et al. 2020]. Для определения численности микромицетов использовали метод высева на агаризованную среду Чапека с стрептомицином. Видовое разнообразие грибного сообщества определяли на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов грибов (ITS2), полученных методом ПЦР с использованием ITS3/ITS4 праймеров (GCATCGATGAAGAACGCAGC / TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Под влиянием нефти, численность микромицетов значительно возросла по сравнению с незагрязненной почвой. Микромицеты были представлены преимущественно филами *Ascomycota* (43-47%), *Basidiomycota* (23-37%) и *Mortierellomycota* (5-7%). В незагрязненной почве лидирующее положение занимали аскомицеты из семейств *Pleosporaceae*, *Plectosphaerellaceae*, *Clavicipitaceae*. В загрязненной почве доля представителей этих семейств снизилась, но возросла доля микромицетов рр. *Aspergillus* и *Penicillium* семейства *Aspergillaceae*. Представители этих родов относятся к числу микроорганизмов, активно разлагающих углеводороды в почве и водной среде [Путилина и др. 2018]. Многие виды рр. *Aspergillus* и *Penicillium* обладают токсигенными свойствами и способны накапливать токсичные метаболиты в широком диапазоне условий обитания [Ефимочкина и др. 2019].

Анализ аллелопатической активности комплекса почвенных микромицетов выявил изменение этого показателя в условиях стрессового воздействия. Метаболиты комплекса микромицетов нефтезагрязненной почвы обладали значительно более сильным токсическим действием по сравнению с метаболитами грибов незагрязненной почвы. Динамика изменения токсических свойств грибных метаболитов свидетельствует о длительном негативном влиянии нефти на почвенную микобиоту. Наиболее заметный эффект наблюдался в первые два года после загрязнения, причем на второй год токсичность метаболитов усилилась. Коэффициенты аллелопатической активности комплекса микромицетов через год после загрязнения выросли на 73%÷120% по сравнению с незагрязненной почвой, а через два года превышали контрольные значения на 300-345%. Токсический эффект снизился через четыре года после внесения нефти. Через шесть лет данный показатель не отличался

от контрольной почвы.

Полученные результаты указывают на важную роль нефтяного загрязнения в происходящих в почве аллелопатических взаимодействиях. Высокая численность грибов, обладающих способностью продуцировать токсины, свидетельствует о сукцессии микробного сообщества и его адаптации к действию загрязняющих веществ. Для более глубокого понимания состава и функций почвенных микромицетов в условиях антропогенного стресса необходимы дальнейшие исследования с использованием методов метагеномного и метаболомного анализа.

Список литературы

Гродзинский А.М. Аллелопатия растений и почвоутомление. К.: Наук. думка, 1991. 432 с.

Ефимочкина Н.Р., Седова И.Б., Шевелева С.А., Тутельян В.А. 2019. Токсигенные свойства микроскопических грибов // Вестник Томского государственного университета. Биология. № 45. С. 6–33.

Киреева Н.А., Кузяхметов Г.Г., Мифтахова А.М., Водопьянов В.В. Фитотоксичность антропогено-загрязненных почв. Уфа: «Гилем», 2003. 266 с.

Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. 2019. Аллелопатические взаимоотношения растений и микроорганизмов в почвенных экосистемах // Успехи современной биологии. Т. 2. С. 147-160.

Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. 2021. Выявление и регуляция антагонистических свойств почвенного актиномицета *Streptomyces sp.* 89 // Известия РАН. Серия биологическая. Т.48. №5. С. 547-555.

Путилина В.С., Галицкая И.В., Юганова Т.И. Процессы биохимической деградации нефтяных углеводородов в зоне аэрации и подземных водах // Геоэкология. 2018. № 3. С. 43–55.

Свистова И.Д., Щербаков А.П., Фролова Л.О. 2004. Токсины микромицетов чернозема: спектр антибиотического действия и роль в формировании микробного сообщества // Почвоведение. № 10. С. 1220-1227.

Callaway, R. M., Ridenour, W. M., Laboski, T., Weir, T., and Vivanco, J. M. 2005. Natural selection for resistance to the allelopathic effects of invasive plants // J. Ecol. 93. P. 576-583.

Cipollini D., Rigsby C. M., Barto E. K. 2012. Microbes as targets and mediators of allelopathy in plants // J. Chem. Ecol. V. 38. P. 714-727.

Einhellig F.A. 1995. Allelopathy: current status and future goals / In K.M. Inderjit, M. Dakshini, and F.A. Einhellig [eds.], Allelopathy: organisms, processes and applications, P. 1-24.

Inderjit. 2005. Soil microorganisms: an important determinant of

allelopathic activity // Plant and Soil. V. 274. P. 227-236.Jilani G., Mahmood S., Chaudhry A., Hassan I., Akram M. 2008. Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil – a review // Ann. Microb. V. 58. P. 351-357.

Polyak Y., Bakina L., Mayachkina N., Polyak M. 2020. The possible role of toxigenic fungi in ecotoxicity of two contrasting oil-contaminated soils – A field study // Ecotoxicology and Environmental Safety. V. 202: 110959.

Reigosa M. J., Pedrol, N, Gonzalez L. 2006. Allelopathy: a physiological process with ecological implications. Springer. 637 p.

ДЕГРАДАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*

Позднякова Н.Н., Турковская О.В.
Саратовский научный центр РАН

Загрязнение окружающей среды природными и техногенными поллютантами является серьезной проблемой. Грибы обладают значительным биохимическим и экологическим потенциалом для их деградации. Способность формировать протяженные мицелиальные сети, низкая специфичность катаболических ферментов и независимость от типа загрязнителя и ростового субстрата делает грибы важным компонентом самоочищающей способности экосистем и перспективным кандидатом для использования в биотехнологиях. Одной из многочисленных групп организмов, вносящих серьезный вклад в процессы самоочищения, являются аскомицеты [1,2].

Аскомицеты рода *Fusarium* широко распространены и отличаются высокой степенью биоразнообразия. Представители этого рода обитают в почве и обнаружены на широком спектре растений. Некоторые специализированные виды паразитируют на других грибах и насекомых [3,4]. За исключением хорошо известных возбудителей фузариоза, большинство видов являются сапротрофами и используют в качестве источников питания сложные углеводы и лигнин [5]. Известны штаммы, образующие взаимовыгодный симбиоз с растениями и даже защищающие их от болезней. Так, например, *F. oxysporum*, выделенный из растения – гипераккумулятора цинка и кадмия Sedumal fredii Hance, не был патогенным для растений, но способствовал росту хозяина, увеличивая растительную биомассу, и повышал эффективность фитоэкстракции [6].

Обычно эти грибы преимущественно разлагают углеводы и пектин в древесине. Были охарактеризованы различные ферменты, участвующие в деградации целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина. Кроме того, они способны минерализовать лигнин, используя внеклеточные системы, которые включают лигнин пероксидазу, марганец-зависимую

пероксидазу, лакказы и ферменты, ответственные за производство H2O2. Эти ферменты также участвуют в различных аспектах физиологии грибов (распад растительных полимеров, детоксикация фенольных соединений, конидиальная пигментация, морфогенез и патогенез) [7-10]. Лакказы продуцируются *F. proliferatum* при заражении проростков пшеницы. Деградация фенольных компонентов в клеточной стенке растения этим ферментом может способствовать патогенному росту *F. proliferatum* [11].

Естественная способность грибов рода *Fusarium* внеклеточно разлагать полимеры, такие как лигнин, лежит в основе их деградативной активности по отношению к поллютантам. Так, например, штамм *F. oxysporum*, выделенный из ризосферы *Polygonum aviculare* L., был способен существенно снижать концентрацию нефти в почве [12]. *F. oxysporum* в составе микробного консорциума показал высокую степень деградации и минерализации различных полициклических ароматических углеводородов (ПАУ: антрацен, фенантрен, пирен) в почве [13]. Консорциум *F. solani* и *Rhodococcus erythropolis* эффективно деградировал бенз[ ]пирен, толуол и формальдегид [14]. Еще один бактериально-грибной консорциум, состоящий из *F. solani* и *Arthrobacter oxydans* при внесении в микрокосмы с люцерной существенно снижал концентрацию фенантрена, пирена и дибенз[a,h]антрацена [15]. Три штамма рода *Fusarium*: *F. solani* H30, *F. solani* H50 и *F. oxysporum* H80 доминировали в почве, обработанной глифосатом и трансформировали его с образованием не идентифицированных метаболитов [16]. *F. solani* деградировал нитроцеллюлозу, что подтверждалось снижением молекулярной массы и содержания азота исходного поллютанта [17].

Несмотря на то, что в настоящее время описано около 52 видов рода *Fusarium* [3], основные исследования деградационных свойств проводятся с представителями 4 видов: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum* и *F. incarnatum*.

Использованный в наших исследованиях штамм гриба был выделен из старых пропитанных креозотом шпал и идентифицирован с применением полифазного подхода, сочетающего морфо-физиологические свойства и результаты молекулярно-генетических исследований как *Fusarium oxysporum* Schltdl. IBPPM 543 (MUT 4558). Гриб был депонирован в Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН и Микотеке Туринского университета (Турин, Италия). Последовательность размещена в Gen Bank под номером MG593980 [18]. В качестве модельных поллютантов были использованы: нефть, пластик (полиэтилентерефталат, ПЭТ), ПАУ, синтетические красители антрахинонового типа, неионогенные ПАВ и алкилфенол. Эксперименты

проводили в условиях глубинного культивирования с поллютантом в качестве единственного источника углерода и в присутствии косубстрата (глюкоза).

Обнаружено, что через 14 сут. культивирования в присутствии ко-субстрата *F. oxisporum* деградировал до 83.2% нефти при стартовой концентрации 0.5 г/л. Кроме того, выявлено, что нефть может служить для гриба единственным источником углерода и энергии. В этом случае убыль составляла около 20%. Исследование изменения фракционного состава нефти показало, что в присутствии ко-субстрата утилизация парафиновой и нафтеновой фракций нефти превышало таковую без ко-субстрата 4-10 раз. Тогда как на убыль ароматических фракций наличие ко-субстрата в среде культивирования влияло незначительно. Наименее доступная фракция нефти – смолы активнее утилизировалась в присутствии ко-субстрата.

Также в качестве единственного источника углерода и энергии *F. oxysporum* использовал ПЭТ. Согласно результатам микроскопических исследований мицелий рос не только на поверхности пластинок, но и проникал в них, о чем свидетельствуют морфологические изменения пластика, отсутствующие в абиотическом контроле [19].

Все остальные использованные поллютанты (ПАУ, синтетические красители, ПАВ и алкилфенол) утилизировались грибом только в условиях ко-метаболизма.

Для исследуемого гриба хорошо были доступны ПАУ: флуорен, фенантрен и флуорантен; деградативная активность составляла от 23 до 45%. Пирен и антрацен были недоступны для *F. oxysporum*, даже при увеличении времени культивирования до 14 сут. Обнаружено, что деградация флуорантена *F. oxysporum* проходила с образованием 9-гидроксифлуорена, 2,2'-дифеновой кислоты, 2-карбоксибензальдегида и фталевой кислоты, идентификацию которых проводили сравнением ВЭЖХ-времен удерживания с таковыми стандартных соединений. Отмечено образование и последующее разрушение образовавшихся метаболитов. Наличие продуктов «глубокой» деградации ПАУ: 2-карбоксибензальдегида, 2,2'-дифеновой и фталевой кислот позволяет предположить в дальнейшем полную утилизацию исходного вещества. При исследовании деградации трех-кольцевого ПАУ – флуорена – предполагаемого метаболита деградации флуорантена показано, что уже через 8 сут. культивирования его убыль достигала 87.7%. Одновременно происходило образование и последующая утилизация основного метаболита – 9-флуоренона. При увеличении времени эксперимента флуорен и его метаболиты в среде культивирования не выявлялись.

Выбранные нами для исследований красители (Acid Blue 62 и

Reactive Blue) относятся к красителям антрахинонового типа и, из-за конденсированных ароматических колец в структуре, являются труднодоступными для деградации. Обнаружено, что оба исследованных красителя обесцвечивались *F. oxysporum* более чем на 50%, при этом для грибной атаки были доступны и ароматическая и хромофорная части молекулы.

В качестве представителя неионогенных ПАВ – в нашей работе использовался оксиэтилированный нонилфенол – неонол АФ9-12. Группа алкилфенолов, являющаяся продуктами неполной деградации ОЭАФ, в нашем исследовании представлена изононилфенолом. Показано, что убыль неонола АФ9-12 составляла 30%, что подтверждалось изменением ИК-спектров образцов, полученных после его деградации. Изононилфенол был недоступен для гриба.

Утилизация исследованных поллютантов *F. oxysporum* сопровождалась образованием эмульгирующих веществ и продукцией внеклеточных ферментов: кутиназы – ключевого фермента процесса деполимеризации ПЭТ и пероксидазы, катализирующие окисление ароматических соединений, включая образующиеся метаболиты.

Полученные данные могут быть использованы для разработки экологических биотехнологий и вносят вклад в понимание процессов деградации/трансформации пластиков в природных экосистемах.

Работа выполнена в рамках темы госзадания №ГР 121031700141-7.

Список литературы

1. Treu R., Falandysz J. Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes – a Review. J. of Environ. Sci. Health. Part B. 2017. 52(3): 148-155.

2. Noman E., Al-Gheethi A., Mohamed R.M.S.R., Talip B.A. Mycoremediation of xenobiotic organic compounds for a sustainable environment: A Critical review. Topics in Current Chemistry. 2019. 377: 17.

3. Zemankova, M., Lebeda, A. *Fusarium* species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. Plant Protect. Sci. 2001. 37: 25-42.

4. Dinolfo M., Castanares E., Stenglein S. *Fusarium*-Plant interaction: State of the art – a Review. Plant Protect. Sci. 2017. 53: 61-70.

5. Michielse C., Reijnen L., Olivain C., Alabouvette C., Rep M. Degradation of aromatic compounds through the -ketoadipate pathway is required for pathogenicity of the tomato wild pathogen *Fusarium oxysporum* f.*sp.* lycopersici. Mol. Plant Pathol. 2012. 13:1089-1100.

6. Zhang X. Lin L., Chen M., Zhu Z., Yang W., Chen B. et al. A nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain enhances phytoextraction of heavy metals by the

hyperaccumulator Sedum alfredii Hance. J. Hazard. Mater. 2012. 229-230: 361-370.

7. Saparrat M., Martinez M., Tournier H., Cabello M., Arambarri A. Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strains isolated from different substrates. World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. 16:799-803.

8. Nimchua T., Punnapayak H., Zimmermann W. Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f.*sp.* pisi. Biotechnol. J. 2007. 2:361-364.

9. Canero D., Roncero *M. F*unctional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 2008. 98: 509-518.

10. Kwiatos N., Ryngajllo M., Bielecki S. Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. Front. Microbiol. 2015. 6: Article 933.

11. Anderson A., Kwon S.-I., Carnicero A., Falcon M. Two isolates of *Fusarium proliferatum* from different habitats and global locations have similar abilities to degrade lignin. FEMS Microbiol. Lett. 2005. 249:149-155.

12. Fariba M., Simin, Alizera M., Ramin N., Doustmorad Z. et al. Phytoremediation of petroleum-polluted soils: application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2010. 73: 613-619.

13. Jacques R., Okeke B., Bento F., Teixeira A., Per*alba* M., Camargo F. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresource Technol. 2008. 99: 2637-2643.

14. Morales P., Caceres M., Scott F., Diaz-Robles L., Aroca G., Vergara-Fernandez A. Biodegradation of benzo[a]pyrene, toluene, and formaldehyde from the gas phase by a consortium of *Rhodococcus erythropolis* and *Fusarium solani*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. doi:10.1007/s00253-017-8400-8.

15. Thion C., Cebron A., Beguiristain T., Leyval C. Inoculation of PAH-degrading strains of *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* in rhizospheric sand and soil microcosms: microbial interactions and PAH dissipation. Biodegradation. 2013. 24: 569-581.

16. Krzysko-Lupicka T., Sudol T. Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. Chemosphere. 2008. 71: 1386-1391

17. Саратовских Е., Щербакова В., Яруллин Р. Деструкция нитрованной целлюлозы грибами *Fusarium solani*. Прикл. биохим. микробиол. 2018. 54: 55-62.

18. Pozdnyakova N., Varese G., Prigione V., Dubrovskaya E., Balandina S., Turkovskaya O. Degradative properties of two newly isolated strains of the ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Lecanicillium* aphanocladii. Int. Microbiol. 2019. 22: 103-110.

19. Позднякова Н., Буров А., Антонов Е., Александрова А., Турковская

О. Исследование способности аскомицетов трансформировать полиэтилентерефталат. Биотехнология. 2022. 38 (5): 106-115.

МИКРОКОЛОНИАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ГРИБОВ ЭКСТРЕМОФИЛОВ НА ФРЕСКАХ XII ВЕКА В СПАССКОМ ХРАМЕ СПАСО-ЕВРОСИНИЕВСКОГО МОНАСТЫРЯ

Ребрикова Н.Л.
Государственный НИИ реставрации, Москва

В последние годы применение новых методов анализа поверхностей позволило визуализировать развитие микроорганизмов in situ, получить новые данные о биоразнообразии грибов, присутствующих на памятниках. В августе 2022 года при обследовании с лесов на фресках Спасской церкви XII века (республика Беларусь) были обнаружены микроколонии ксерофильных грибов. Ранее в составе микобиоты настенных росписей ксерофилы не встречались.

Древние фрески Спасской церкви сохранились, несмотря на сложную историю существования церкви и Спасо-Ефросиниевского монастыря. Во время пребывания в монастыре иезуитов древние фрески церкви неоднократно забеливались. В XIX веке (1834–1835 гг.) стены церкви расписали масляными красками. Впоследствии масляную живопись неоднократно поновляли. В начале 1990-х годов началась реставрация стенописи, которую возглавил минский художник-реставратор и исследователь В. В. Ракицкий. В 2007 году в целях ускорения раскрытия фресок к работам были подключены московские специалисты под руководством художника-реставратора В. Д. Сарабьянова, главного искусствоведа Межобластного научно-реставрационного художественного управления (МНРХУ). В течение ряда лет большая часть фресок была раскрыта.

В 2021 году для проведения реставрационных работ в церкви, в том числе и на живописи, были установлены леса со сплошными настилами. Леса уменьшили подвижность воздуха в храме, что способствовало появлению микроколониальных форм грибов в рукавах на склонах арок. Другим фактором, благоприятным для роста грибов-ксерофилов – это остатки масляного связующего записи, которые ранее не удалось полностью удалить в процессе расчистки древней живописи. Проведенные ранее исследования грибов-ксерофилов показали, что они развиваются на гидрофобных поверхностях, на которых впитывание воды затруднено, вследствие этого часть конденсационной влаги поглощается находящимися на них загрязнениями. В результате

возникают условия для роста ксерофилов, в качестве источника углерода они используют органические вещества в составе поверхностных загрязнений (пылевых отложений).

При визуальном обследовании колонии микроскопических грибов были обнаружены в скуфье на вставке, развитие которых произошло вследствие протечки кровли. Колонии экстремальных ксерофилов на фресковой живописи при визуальном обследовании было сложно отличить от скоплений поверхностных загрязнений. Непосредственно на стене с помощью цифрового USB-микроскопа Levenhuk DTX 90 удалось визуализировать микроколонии ксерофилов. Они были обнаружены на следующих композициях: Дьякон Стефан, первосвященник Елеазар, расположенных на южном откосе подпружной арки, а также на реставрационной штукатурке в западном рукаве.

Микроколонии ксерофильных грибов на фоновых участках и на одежде дьякона Стефана и первосвященника Елеазара располагались на более темных в сравнении с окружающими участках живописи, предположительно остатках масляной записи. Микроскопное исследование колоний на месте роста позволило обнаружить конидиеносцы, характерные для рода *Aspergillus* и небольшое количество мицелия, цвет которого изменялся от темно до светло-серого, что затем подтвердилось при микроскопном (Leica EZ 4D) исследовании в лабораторных условиях.

В отличии от ксерофилов на вставке в скуфье при использовании цифрового микроскопа наблюдался сплошной рост колоний грибов, преобладающими формами были два вида рода *Aspergillus*, присутствовали колонии *Penicillium sp.* и с одного края вставки поверх колоний *Aspergillus* и *Penicillium* развивался микофил - *Acremonium sp.*, что также подтвердилось при микроскопном исследовании в лабораторных условиях.

В лаборатории с фрагментов вставки в скуфье, отобранных на памятнике, были сделаны микологические посевы на среду Чапека и среду Чапека с крахмалом. Небольшое количество исследуемого материала с помощью глазного скальпеля с соблюдением правил асептики переносили в разные сектора чашки Петри диаметром 9 см. Во всех посевах можно было наблюдать начало развития колоний грибов на второй день. Через шесть дней во всех посевах выросли колонии *Penicillium sp.*, которые быстро развиваются на питательных средах, и которые ингибировали рост колоний *Aspergillus sp.* Таким образом, результаты посева не выявили доминирующих форм грибов, наблюдаемых при исследовании на месте роста. В таких случаях надо делать посев методом рассева пробы, делая первый укол и последующие

восемь, используя один раз взятый материал.

Небольшие фрагменты штукатурки из западного рукава и пробы, полученные путем соскоба микроколоний с поверхности стенописи, композиция дьякон Стефан, были отобраны для микроскопии и посевов в условиях лаборатории. Из материала, отобранного с поверхности стенописи (дьякон Стефан) и с поверхности штукатурных вставок в западном рукаве были приготовлены препараты для микроскопии в проходящем свете. В результате исследования с помощью микроскопа Leice DM LS2 в пробах с дьякона Стефана обнаружены крупные конидии, конидиеносцы *Aspergillus*, иногда уродливой формы и пенициллоподобные конидиеносцы, в пробах со штукатурных вставок – крупные конидии, конидиеносцы *Aspergillus* и пенициллоподобные конидиеносцы.

Посев путем переноса небольшого количества материала из микроколоний с помощью глазного скальпеля на поверхность среды Чапека в разные сектора чашки Петри дал отрицательные результаты. Ни в одном из сделанных посевов не началось развитие колоний грибов, отсутствие роста на среде с высокой активностью воды характерно для экстремально ксерофильных форм грибов. В результате посева на среду Чапека со сниженной активностью путем добавления NaCl (итоговая концентрация NaCl в среде 17%) в части посевов проб с дьякона Стефана и проб со вставок штукатурки в западном рукаве началось развитие колоний *Aspergillus penicilloides*, экстремального ксерофильного вида.

Ранее на настенной живописи микроколонии экстремально ксерофильных видов не встречались. В результате мониторинга сохранности уникальных росписей XII века Спасской церкви Спасо-Ефросиниевского монастыря (республика Беларусь) выявлена ещё одна экологическая ниша для роста экстремально ксерофильных форм микромицетов.

РОЛЬ ФИТОСАНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ГОРОДСКИХ ПАРКОВЫХ ЗОН ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ ГОРОЖАН

Щербакова Т.И., Лунгу А.А., Кручеан Ш.М.
Государственный Университет Молдовы, Кишинев

Здоровье человека в условиях жизни в мегаполисе подвергается широкому спектру экологических рисков и нагрузок на организм. Помимо физических (шум, электромагнитные поля и др.) и химических (выхлопные газы, промышленные выбросы, вредные вещества бытовой химии и пр.), существует ряд биологических вредных факторов. К их числу можно отнести природные аллергены, такие как пыльца растений

и споры плесневых грибов микромицетов [1]. Плесневые грибы являются частой причиной аллергических заболеваний человека - аллергического ринита, конъюнктивита, атопического дерматита, бронхиальной астмы. В этом плане плесени оказывают более значимое воздействие на иммунную систему пациента, чем пыльца или другие бытовые аллергены [2].

В зоне риска находятся люди, имеющие сенсибилизацию к плесневым грибам. Для них различные варианты контакта со спорами (через слизистые, кожу и пищу) вызывают аллергические реакции, включая чихание, насморк, покраснение глаз и сыпь на коже. Люди с высоким классом сенсибилизации и коморбидных заболеваний (астма, синусит) имеют более серьезные реакции, включая кашель, одышку и обострение астмы. Кроме людей с аллергией и астмой, более чувствительными к воздействию плесневых грибов могут быть: младенцы и дети раннего возраста, люди пожилого возраста, люди, иммунная система которых ослаблена из-за ВИЧ-инфекции, рака, заболевания печени или химиотерапии, люди с хроническими заболеваниями легких. Мировые исследования подтверждают наличие разнообразия плесневых грибов, которые являются причиной развития сенсибилизации и клинических симптомов у детей и взрослых. В настоящее время наиболее общепризнанными аллергенами являются грибы родов *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Общий уровень сенсибилизации к грибковым аллергенам был оценен как 8,3% в исследовании среди детей в Германии, но значительно выше у пациентов с атопией, особенно у пациентов с тяжелой астмой [3].

Для улучшения здоровья горожан большое значение имеют зеленые насаждения и парковые зоны, выполняющие несколько функций: рекреационную, гигиеническую, эстетическую, оздоровительную. Городской зеленый массив позволяет снизить степень загрязнения окружающей среды транспортными и промышленными выбросами, уменьшить шумовое воздействие, улучшить микроклимат города и создать комфортные условия для жизни населения. Зеленые насаждения используются медицинскими центрами как форма естественной терапии для борьбы с болезнями, поскольку существует положительная связь между здоровьем и природой. Ряд исследований показали, что время, проведенное в естественной зеленой среде, снижает нервную активность, повышает иммунитет, стабилизирует частоту пульса, снижает холестерин, уровень кортизола в слюне (гормон стресса), а также систолическое и диастолическое артериальное давление [4].

Городские зеленые насаждения – это особый элемент урбанизированной среды и область пересечения интересов различных социальных групп. В

отчете муниципального совета г. Кишинева в 2020 году площадь зеленых насаждений общего пользования (скверы, парки, лесопарки и зеленые насаждения вдоль дорог) в муниципии Кишинева составила 4192,1 га, а на одного городского жителя приходилось более 58 м2 зеленых зон отдыха [5].

Важнейшим фактором негативного воздействия на состояние городских зеленых насаждений является комплекс болезней. В доступной литературе и базах данных не представлена информация о состоянии зеленых насаждений г. Кишинева за последние 10 лет, об основных патогенах, вызывающих болезни таких широко произрастающих в муниципии деревьев как каштан, виды клена, виды липы, грецкий орех, хвойные. Поэтому исследования были направлены на проведение оценки фитосанитарного состояния листвы отдельных представителей древесных лиственных и хвойных насаждений, произрастающих в различных районах г. Кишинева в период вегетации 2021 года.

Фитосанитарные исследования. Для оценки фитосанитарного состояния древесных насаждений были отобраны пробы пораженных листьев наиболее типичных для г. Кишинева листопадных растений: липа, каштан, клен, вяз, орех грецкий. Для оценки состояния хвойных пород отбирали пробы пораженной хвои ели, сосны, туи, можжевельника. Сбор листьев и хвои проводили в начале августа 2021 г. из нижней части кроны, на уровне поднятой руки, стараясь задействовать ветки разных направлений (север, юг, запад, восток). Для анализа использовали средневозрастные растения. С каштана и сосны дополнительно были отобраны плоды.

Микробиологические исследования. Выделение возбудителей гнилей из растительного материала проводили стандартным методом [6]. Пораженные листья и хвою поверхностно стерилизовали 2%-м раствором перманганата калия в течение 1 минуты и промывали стерильной водой. Затем их разрезали стерильным скальпелем на кусочки и помещали в стерильные чашки Петри на сусло-агаровую среду с добавлением 80%-й молочной кислоты, инкубировали в течение 1-7 суток при 250С. Выросшие грибы отсевали для получения чистой культуры, микроскопировали для определения родовой принадлежности.

Места отбора проб: 1) Городской Парк Валя Морилор, сектор Центр, 2) Городской Парк Рышкань, северо-западная часть города, 3) Сектор Ботаника, юго-восточная часть города, 4) Территория Института генетики, физиологии и защиты растений.

Результаты. В насаждениях г. Кишинева наиболее широко распространены болезни листьев. В период сезона вегетации 2021 г. на всех лиственных видах деревьев отмечен высокий уровень распространения

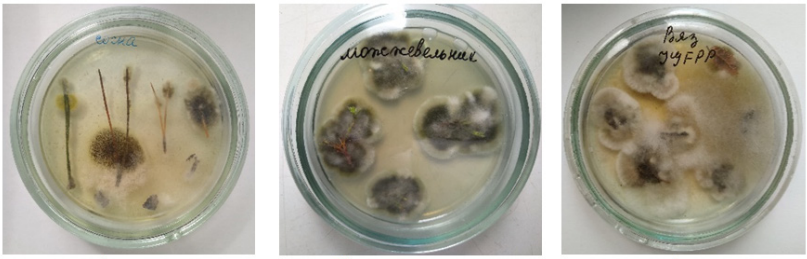
мучнистой росы - грибы порядка Erisiphales, облигатные паразиты высших растений, на питательных средах не культивируются. При выделении других грибов из пораженных листьев и хвои обозначился комплекс патогенов, практически одинаковый из всех мест сбора проб (табл. 1).

Таблица 1. Присутствие плесневых грибов на листве древесных насаждений города Кишинева летом 2021 г.

Название растений, (место отбора)	**Названия выделенных микромицетов**
Каштан конский, *Aesculus hippocastanum L.*, (1), (3), (4)	*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger, Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Rhizopus sp.*
Липа, *Tilia* L. (1)	*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger, Penicillium sp.*, *Curvularia sp.*
Клен, *Acer* L. (1)	*Alternaria sp.*, *Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Rhizopus sp.*
Вяз, *Ulmus* L. (3), (4)	*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger, Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Rhizopus*
Сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L., (1)	*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger, Aspergillus flavus,* на шишках *Alternaria sp.* и *Fusarium sp.*
Сосна обыкновенная *P. sylvestris* L., (2)	*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.*
Ель *Picea* A. Dietr. (4)	*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger, Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Rhizopus sp.*
Можжевельник *Juniperus* L. (4)	*Alternaria sp.*
Можжевельник колючий *Juniperus oxycedrus* L. (3)	*Alternaria sp.*, *Rhizopus sp.*
Туя *Thya* L. (1)	*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger, Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.*,
Орех грецкий, *Juglans regia* L. (1), (2), (3), (4)	*Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*

На листьях и хвое всех деревьев в преимуществе присутствовали грибы *Alternaria sp.* Они выделялись во всех пробах. *Aspergillus niger* отмечен

на листве всех лиственных пород, в меньшей степени на хвойных – елях и соснах. *Fusarium sp.* на лиственных являлся вторичным патогеном, сильнее поражал хвою сосны и ели. Грибы *Penicillium sp.* и *Aspergillus flavus* встречались в меньшинстве. На сосне и ели прослеживался комплекс гнилей, поражающий хвою: основание игл поражено фузариозом, кончики – грибами *Alternaria*, средняя часть - грибами *Aspergillus* (рис. 1).



a) сосна b) можжевельник c) вяз

Рис. 1. Выделение плесневых грибов из пораженной листвы и хвои.

Интенсивному развитию гнилей на листве древесных культур и сохранению их спор в зимний период способствовали благоприятные погодные условия, начиная с осени 2020 года. Сумма выпавших осадков за сентябрь-декабрь составила 246 мм при норме 171 мм (143% от нормы). Не наблюдалось дефицита влаги и с начала 2021 года. Сумма осадков в январе-июле составила 463 мм при норме 327 мм (141% от нормы) [7].

Благоприятная среда для развития плесневых грибов – это дождливая пасмурная погода с умеренной температурой. Большое количество спор плесневых грибов в парках и скверах отмечается в начале осени на увядающих растениях и опавшей листве. Накопившись на растительных остатках за зимний период, весной с таянием снега происходит активное освобождение спор, их прорастание и развитие мицелия. Переносимые ветром и каплями дождя, они проникают в организм каждый раз, когда человек делает вдох. Большинство людей не реагирует на этот раздражитель, но у восприимчивых пациентов могут развиваться аллергические реакции [8].

По результатам выполненной работы можно отметить, что из основных видов плесневых грибов, чаще всего вызывающих развитие аллергий - *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus*, на листве и хвое зеленых насаждений города Кишинева присутствуют три из четырех названных выше аллергена [9].

Для оздоровления городских парковых зон, снижения уровня загрязнения воздуха и пространства спорами плесневых грибов, безопасного отдыха горожан рекомендуется проводить фитосанитарные мероприятия с применением биологических средств защиты растений. Улучшение фитосанитарного состояния зеленых зон отдыха в г. Кишиневе скажется позитивно на улучшении здоровья жителей города.

Благодарности:
Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Государственной программы № 20.80009.7007.16 „Sinergismul dintre factorii naturali i mijloacele microbiologice, ecologic inofensive, de reglare a densit ii popula iilor de organisme d un toare pentru protec ia culturilor agricole n agricultura conven ional i ecologic ” Республики Молдова.

Список литературы

1. Богомолова Е.В., Уханова О.П., Санеева И.В. Микологические факторы риска в городской среде. Известия Самарского научного центра РАН. 2016, т. 18, №2 (3), с. 637-641.
2. Христова Д., Кандова Я., Николов Г., Петрунов Б. Сенсибилизация к аллергенам плесневых грибов у пациентов с респираторной аллергией. Оптимизация диагностического процесса. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020, 97(2), с. 119-124.
3. Аллергология и клиническая иммунология / под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019, 336 с.
4. Khan, M.M.; Akram, M.T.; Janke, R.; Qadri, R.W.K.; Al-Sadi, A.M.; Farooque, A.A. Urban Horticulture for Food Secure Cities through and beyond COVID-19. Sustainability 2020, 12(22), 9592. Доступ: https://doi.org/10.3390/su12229592. [Дата обращения 10.04.2023].
5. Structura, destina ia i suprafa a spa iilor verzi. Prim ria municipiului Chi in u. Доступ: https://www.chisinau.md/public/files/Structura_destinatia_si_suprafata_spatiilor_verzi.pdf. [Дата обращения 10.04.2023].
6. Бёхтер И. и др. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. /Пер. с нем. К.В. Попковой, В.А. Шмыгли. М.: Агропромиздат, 1987, 224с.
7. Pogoda i klimat. Доступ: http://www.pogodaiklimat.ru/archive.php. [Дата обращения 10.04.2023].
8. Gabriel M., Postigo I., Tomaz C., Martinez J. *Alternaria alternata* allergens : Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. Environment International, vol. 89-90, 2016. P. 89-90. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.003.

9. Стратулат Т., Щербакова Т., Кручеан Ш., Лунгу А. Пораженность листвы древесных насаждений города Кишинёва комплексом гнилей летом 2021 года. Conf. tiin ific Interna ional „Genetica, Fiziologia i Ameliorarea Plantelor", edi ia VII-ea, 4-5 octombrie 2021, p. 342-345.

ОБСЕМЕНЕННОСТЬ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ ОБЪЕКТОВ СТАНКОВОЙ ЖИВОПИСИ

Шегурова А.Ф., Мануйлов С.И.
ГУП, Мытищи

Плесневые грибы, как биодеструкторы, разрушают объекты искусства, расширяя в них трещины, выделяя токсичные продукты жизнедеятельности. Памятники культурного наследия становятся хрупкими, теряют свой первозданный вид и историческую ценность [1-4].

В целях сохранения произведений искусства необходимо проводить их регулярный мониторинг, направленный на выявление уровня микогенной контаминации. Это позволит своевременно отреагировать на повышающуюся активность микромицетов и провести соответствующие защитные мероприятия на памятниках культурного и исторического наследия [2,3].

Целью нашей работы являлось определение обсемененности плесневыми грибами объектов станковой живописи Мастерской академической живописи (г. Мытищи).

Для выполнения нашей исследовательской работы отбирали пробы методом смыва с поверхностей. Пробы смывов отбирались в Мастерской академической живописи. Было отобрано 90 смывов с поверхности 6 масляных картин, отбор проводился с трех разных по составу поверхностей (красочный слой; задняя поверхность холста; деревянная рама) [1,4].

В день отбора материал был доставлен в лабораторию Государственного университета просвещения, затем высеивался на чашки Петри на предварительно приготовленную и проконтролированную питательную среду Чапека. Чашки с посевами инкубировались в термостате 7 дней при температуре 25°С. В процессе инкубации со второго дня чашки ежедневно просматривались на наличие роста колоний грибов.

Подход к идентификации плесневых грибов основывался на изучении макро- и микро-морфологических признаков. При рассмотрении макро-морфологических признаков микромицетов основными факторами оценки являлись культуральные признаки – размер, цвет, структура, строение наружного края и центра. При микроскопии плесневых

грибов оценивали характеристику мицелия, конидиальных структур (спороносный аппарат) и самих спор. При проведении идентификации и результатов культивирования в течении своей работы руководствовались определителем В. И. Билай и Э. З. Коваля [5].

В результате проведенных исследований из 90 отобранных смывов был получен рост в 20 случаях.

На исследованных поверхностях были обнаружены грибы: *Aspergillus niger* (62,5%), *Aspergillus sp.* (14,3%), *Aspergillus fumigatus* (12,5%), *Aspergillus flavus* (7,1%), *Penicillum sp.* (3,6%).

Выводы.

Наиболее часто из смывов с картин выделялся гриб *Aspergillus niger.*

По результатам проведенных исследований также установлено, что картины, с которых было выделено наибольшее количество плесневых грибов, висели в наиболее часто посещаемых аудиториях Мастерской академической живописи. Потенциальное загрязнение, вероятно, связано с попаданием грибов в помещение вместе с наружным воздухом, с пылью, поднимающейся с пола, и с частичек почвы с подошв студентов и посетителей Мастерской.

Исходя из вышесказанного, для снижения загрязненности станковой живописи картины необходимо регулярно очищать от пыли, проводить текущие уборки с применением моющих и дезинфицирующих средств в помещениях и проветривание с утвержденным внутренним регламентом и распорядком мастерской.

Список литературы

1. Ребрикова Н.Л. Руководство по диагностике микробиологических повреждений памятников искусства и культуры. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 80 с.

2. Арсланова М.М., Ямпольская Т.Д. Микроорганизмы как биодеструкторы различных материалов // Вестник СурГУ. 2015. №3

3. Кондарюк Т.А., Захарченко В.А., Наконечная Л.Т. Экологическая оценка микромицетов, развивающихся на стенах музейных помещений и музейных предметах. Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Украина, 2002. С. 60.

4. Великова Т. Д., Попихина Е. А. Инструкция по отбору микробиологических проб с поверхности документов // лабораторные методики и технологические инструкции по практической консервации документов. СПБ.: РНБ, 2019. с. 107–111.

5. Билай В.И., Коваля Э.З. Аспергиллы. – Киев: Наук.думка, 1988. – 204 с., ил.

О ПЕРСПЕКТИВЕ ПРИМЕНЕНИЯ В МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ «ЗАЩИТНЫХ» КУЛЬТУР – ВЗГЛЯД ГИГИЕНИСТОВ

Шевелева С.А., Ефимочкина Н.Р., Смотрина Ю.В.
ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва

Идея об использовании при производстве кисломолочных продуктов массового потребления в составе основных заквасок «защитных» культур - дополнительных микроорганизмов, селекционированных по выраженному эффекту антагонизма в отношении дрожжей и плесневых грибов, с целью подавления развития в готовой продукции этих возбудителей порчи и увеличения сроков её годности, сегодня активно продвигается за рубежом, в первую очередь в Европе. Основными аргументами являются минимизация количества отходов продукции, как в розничной сети, так и в домохозяйствах, и, соответственно, снижение экономических потерь, расширение географии поставок и экспорта продукции в другие страны. Дискуссии на эту тему развернулись и среди российских специалистов.

В процессе предпринятого анализа научных публикаций и нормативной базы по использованию «защитных» культур в производстве кисломолочных продуктов, нами признано необходимым наряду с экономической заинтересованностью, учитывать аспекты регуляторного, медико-биологического и технологического характера.

Так, сегодня понятие «Защитные культуры» (ЗК) включено в действующий в РФ и на территории ЕАЭС межгосударственный стандарт ГОСТ 34372-2017 «Закваски бактериальные для молочной продукции. Технические условия», применяемый на добровольной основе. Согласно ГОСТ к ЗК относятся культуры, обладающие антагонистической активностью против посторонних микроорганизмов. Но они не могут быть дополнительными к основной закваске: их видовой состав должен соответствовать составу микрофлоры производимой продукции и не отличаться от видов, входящих в закваску, а применение не должно приводить к искажению регламентируемых физико-химических и органолептических показателей продукции.

Это согласуется с техническим регламентом ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочных продуктов», который не рассматривает в качестве функционально компонентов, необходимых для производства продуктов переработки молока, никакие нецелевые культуры, дополнительные к заквасочным. Более того, в соответствии с ТР ТС 033 все традиционные кисломолочные продукты (сметана, творог, йогурт, простокваши и др.) регламентируются по родовому и видовому

составу заквасочной микрофлоры (йогурт должен изготавливаться с использованием термофильных молочнокислых стрептококков и молочнокислой болгарской палочки, сметана - с использованием лактококков или смеси лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков и т.п.). Изменение состава заквасочной микрофлоры таких продуктов не допускается, использование в составе заквасок неспецифических для соответствующих видов молочной продукции ЗК противоречит ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочных продуктов».

Согласно сведениям литературы, наибольший интерес среди ЗК, циркулирующих на мировом рынке, представляют ЗК на основе молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. buchneri*, *L. amylovorus* и др.), педиококков, лейконостоков с повышенной противогрибковой активностью, природа которой опосредуется метаболитами с разным химическим составом (циклические дипептиды, салицилаты, пропионаты, алкилкетоны, гидроксикислоты и др.). Предложения о применении в основном базируются на наблюдениях за взаимоотношениями между молочнокислыми бактериями и грибами в природных экосистемах [1, 2]. Тогда как сами вещества с противогрибковой активностью, синтезируемые лактобактериями, мало изучены, также как и не изучались последствия их постоянного потребления с молокопродуктами на микробиоту кишечника.

Наряду с антифунгальными веществами антагонистически активные штаммы лактобактерий способны продуцировать соединения с антибактериальной активностью - бактериоцины низин, плантарицин, педиоцин и др. [2], потенциальным негативным эффектом которых является их способность ингибировать рост близкородственных видовых представителей технологической микрофлоры в смешанных заквасках, а при поступлении в кишечник с пищей – в составе микробиоты. Кроме того, для ряда из них сегодня выявлен общий геномный механизм формирования резистентности к антибиотикам, применяемым в медицине. В частности, показано, что присутствие низина в пищевых продуктах способствует развитию ко-резистентности к 2-5 препаратам у патогенных и условно-патогенных бактерий-контаминантов пищи [3]. Соответственно, область применения и, главное - количественное содержание бактериоцинов при их использовании в качестве пищевых добавок и БАД строго регламентируется. В то время как вопрос о дозах антифунгальных веществ, продуцируемых ЗК в процессе ферментации в молоке, нигде не освещен.

Таким образом, важным моментом при решении вопроса о допуске ЗК в производство кисломолочных продуктов, которые составляют

существенную долю в ежедневных рационах россиян всех возрастов, и в первую очередь детей и пожилых людей, и в которых указанные культуры могут достигать высоких уровней содержания в жизнеспособном виде (десятки и сотни миллионов КОЕ/г), является необходимость изучения влияния таких культур и их метаболитов на состав нормофлоры кишечника и индукцию антимикробной резистентности.

Специалистами молочной отрасли высказывается обоснованное мнение о том, что введение нехарактерной для конкретного кисломолочного продукта микрофлоры может приводить к снижению активности основной заквасочной микрофлоры, а дополнительные культуры могут получить возможность более интенсивного размножения с непредсказуемым влиянием на качество продукции [4]. Важно при этом учитывать, что ряд лактобацилл с защитными свойствами – слабые кислотообразователи или не способны к выработке молочной кислоты. Описана вероятность возникновения антагонистического воздействия ЗК на основную микрофлору заквасок и её вытеснение, особенно в случае продуцирования этими культурами бактериоцинов, что чревато нарушением скорости накопления молочной кислоты и процесса молочнокислого брожения.

Исходя из выше написанного, включение в рецептуру заквасок для традиционных кисломолочных продуктов дополнительных культур, с отличающимся от регламентированных родовым и видовым составом, не может быть индифферентным для протекания процесса их производства, а также для органолептических и физико-химических показателей вырабатываемой продукции.

Кроме того, важно отметить, что мишени защитных культур - возбудители микробной порчи дрожжевые и плесневые грибы - не являются представителями естественной флоры молока. Контаминация ими готовой продукции происходит из объектов окружающей среды на производстве (воздух, вода, оборудование, руки и одежда персонала) при его низком или недостаточном санитарном обеспечении. Соответственно, ведущей мерой борьбы с ними для стабильности продукции в хранении должно выступать не использование дополнительных культур, привносящих в состав продукта вещества с антимикробным действием (по сути микроорганизмов-продуцентов потенциальных пищевых добавок-консервантов), а высокое качество перерабатываемого сырья, строгое соблюдение режимов технологии, НАССР и гигиены производства, установленных условий хранения и реализации продукции.

Изложенные положения позволили придти к выводу, что возможность включения дополнительных микроорганизмов с защитными свойствами

в состав регламентированных заквасочных культур для традиционных кисломолочных продуктов не имеет достаточного научного и медико-биологического обоснования, требует оценки со стороны технологов молочной отрасли, разработки и внесения соответствующих изменений в ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции».

Применение ЗК может рассматриваться только в качестве дополнительного фактора повышения хранимоспособности кисломолочных и сквашенных молокосодержащих продуктов, конкретный видовой состав заквасочных микроорганизмов для которых не регламентирован ТР ТС 033/2013, с учётом упомянутых выше положений ГОСТ 34372. При этом целесообразно проведение экспертизы ЗК, как продуктов нового вида, для подтверждения их подлинности, безопасности и оценки изготовленной на их основе пищевой продукции, подтверждающей отсутствие её вредного воздействия на кишечную микробиоту потребителей.

Список литературы.

1. Siedler Solvej, Balti Rafik, Neves Ana Rute. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. /Current Opinion in Biotechnology.-2019, V. 56, p. 138-146, doi:10.1016/j.copbio.2018.11.015.

2. Стоянова Л.Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий Lactococcus lactis *subsp.* lactis с антимикробным действием. // Известия ТСХА,.- 2017, выпуск 5, с.41-61, DOI: 10.26897/0021-342X-2017-5-41-61

3. Багрянцева О.В., Хотимченко С.А., Петренко А.С., Шевелева С.А., Арнаутов О.В., Елизарова Е.В. Антибиотические свойства низина в контексте его применения в качестве пищевой добавки. //Гигиена и санитария. -2020; 99 (7), с. 704-711. DOI: 10.33029/0016-9900-2020-99-7-704-711

4. Свириденко Г.М., Сорокина Н.П. Защитные культуры при производстве ферментируемых молочных продуктов//Переработка молока. -2019.- № 6 (236), с.10-13, DOI: 10.33465/2222-5455-2019-6-10-13

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ УТИЛИЗАЦИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ И ОЦЕНКА ПРОДУКТОВ ИХ КОНВЕРСИИ

Шонахунов Т. Э., Ахмедова З. Р., Яхяева М.А, Хамраева З.Т.
Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

В последнее время большую актуальность приобретает поиск новых путей утилизации различных отходов сельского хозяйства и промышленности с использованием различных классов микроорганизмов, особенно грибов, имеющие пищевое значение и

кормовое назначения в сельском хозяйстве.

С использованием древесных отходов, соломы и навозов различных видов и съедобных грибов можно получить плодовые тела, имеющие очень ценный состав не только для пищевого, но и фармацевтического направления.

Микопродукт, т.е. урожай широко культивируемых съедобных грибов несет полноценный состав компонентов питания: протеина, пищевых волокон, липидов, минеральных элементов и витаминов Из имеющиеся более 200 видов базидиальных съедобных грибов широко культивируемыми являются *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Fomes fomentarius Inonotus hispidus*., *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* и др. (Ахмедова. 1994, Chang, 1999; ISMS, 2017; Royse, 2017).

Рентабельность производства съедобных грибов можно повысить в случае использования промышленных отходов, в частности бродильного производства.

Вторичный отход производство пищевого этанола на четырех заводах Республики Узбекистан (ОАО "Бектемир спирт", "Куконспирт", "Андижон биокиме заводи", "Янгиюл биохим") составляет огромное количества и во много раз превышает объем производимого этанола (135–150 м3 на 1000 дал этанола) и большая часть данного отхода выбрасывается в канализационные узлы, что причиняет вред окружающей среде (Akhmedova, 1993).

Помимо производства плодовых тел, высшие грибы и их мицелии, образующиеся в глубинных условиях культивирования является ценным кормовым продуктом в животноводства. Так например, в 1965 г. впервые был использован субстрат обогащенный белком с помошью гриба *Agaricus bisporus.* Данный «Микокорм» успешно было использована в качестве кормового продукта для вскармливания крупного рогатого скота (Mirjam et al., 2017; Geml et al., 2008).

В литературе имеются множества сведений, касающийся использованию различных отходов и высших грибов для производства плодовых тел, ферментов, витаминов, биологически активных добавок и множеств продуктов, имеющие ценное значения в грибной биотехнологии (Kerriga, 1995; Kolesnikova, Ptskialadze, 1999; Ten Have, 2001; Callac et al., 2002; Melnikova et al., 2008; Mirjam et al., 2017; Wood, 1980; Hofrichter et al., 2015), что следует далее провести углубленные исследования в этом направлении. .

Поэтому, целью данной работы было оценка ферментативной активности, накопления белка и биологически ценных продуктов в культуральной среде с использованием местных штаммов базидиальных грибов и отхода спиртового завода и послеспиртовой зерновой барды в

качестве единственного источника углерода в питательной среде.

Помимо, образования белков, биомассы и в среде культивирования наблюдали образование ферментов, различными свойствами действия. Помимо целлюлазы, ксиланазы, пероксидазы и др, изученные культуры грибов проявили высокую протеолитическую активность. Относительно высокая протеолитическая активность обнаружена в фильтрате КЖ Agaricus *bisporius* УзБИ 12 на модифицированной среде с бардой к 96 ч роста гриба, которая составила 0.14 ед /мл.

Для проявления высокой активности ферментов и продуктивности грибов, помимо питательной среды, большое значение имеют физико-химические факторы роста, способы и условия культивирования.

Изучение активности ферментов *A. bisporius* УзБИ 2 показало, что при 30°С наблюдали наибольшее накопление белка в культуральной среде к 96 и 120 ч роста. Активность ферментов наблюдали также при 30°С, особенно к 120–144 ч роста гриба. Ксиланазная активность была выше при всех температурах и сроках роста *A. bisporius* УзБИ 2 по сравнению с целлюлазной активностью.

Аналогичную картину по накоплению белков и активности ферментов в зависимости от температуры культивирования наблюдали для *A. bisporius* УзБИ 12 Активность ферментов у этого штамма была ниже, чем у *A. bisporius* УзБИ 2.

Изучение накопления белка и активности ферментов штамма *Pleurotus ostreatus* УзБИ 108 при его культивировании при разных температурах проводили в течение 13 суток (312 ч). Наибольшее количество белка и более высокая ферментативная активность были выявлены при температурах 25–30°С. Максимальная концентрация белка (38.2 мг/мл) была зафиксирована на 10-е сутки роста. Было также показано, что ксиланазная активность у этого штамма была несколько выше, чем целлюлазная, однако в динамике роста штамма активность ферментов менялась незначительно. Максимальные значения ксиланазной активности достигали 3.7 ед./мл на 11-е сутки роста при 25°С, тогда как целлюлазная – 3.5 ед./мл на девятые сутки при 25°С. Для *P. ostreatus* УзБИ 108 отмечали накопление белка в КЖ до 240-часового роста при 25°С.

Анализ белков в гидролизатах грибов показал, что все исследованные штаммы имели полноценный аминокислотный состав. Преобладающим являлся глутамин, причем если в составе зерновой барды концентрация глутамина составляла 0.036051 мг/мл то после ферментация на данном субстрате *Agaricus bisporius* УзБИ 12 его содержание достигло 4.112774 мг/г, *A. bisporius* УзБИ 2 – 4.69535 мг/г, а *Pleurotus ostreatus* УзБИ 108 – 10.68413 мг/г. Следующим по высокому содержанию являлся цистеин: его концентрация в исходной барде составляла 0.036051 мг/г, после

ферментации *Agaricus bisporius* УзБИ 12 – 1.650142 мг/г, *A. bisporius* УзБИ 2 – 2.358357 мг/г, *Pleurotus ostreatus* УзБИ 108 – 3.371105 мг/г.

Общая сумма аминокислот ферментированных грибами по сравнению с исходной бардой (1.397052 мг/г) существенно возросла: Agaricus *bisporius* УзБИ 12 – 36.04619 мг, *A. bisporius* УзБИ 2 – 22.62895 мг и *Pleurotus ostreatus* УзБИ 108 – 17.82402 мг/г.

Было показана возможность активной биоконверсии зерновой барды с использованием грибов *P. ostreatus* УзБИ 108, *Agaricus bisporus* УзБИ 2 и *A. bisporus* УзБИ 12 и получением продуктов, обогащенных белком с полноценным аминокислотным составом, а также обладающих высокой активностью гидролитических ферментов.

Среди трех испытанных культур базидиомицетов наибольшую активность и продуктивность по ферментативной активности показал *Agaricus bisporus* УзБИ 2, по аминокислотному составу – *Pleurotus ostreatus* УзБИ 108.

Вышеуказанные данные полученные нами согласуется с данными с литературными источниками, изложенные во множества работах (Biryukov et al., 2002; Bitteeva et al., 2002). Так например, некоторыми авторами был предложен запатентованный способ получения белковой биомассы путем глубинного культивирования гриба *Pleurotus pulmonarius* PP-3.2 на крахмал-аммонийной среде в условиях аэрации при pH 5.5–6.0 и 23–25°C. Авторы предлагали получать белковые пищевые добавки для использования в хлебопекарной, мясоперерабатывающей и других отраслях пищевой промышленности с целью обогащения пищевых продуктов высококачественным грибным белком, содержание которого составляло 31.2% (Patyshakuliyeva, et al. 2015). М.Б. Биттеевой с соавторами (Bitteeva, 2002) также отмечалось, что базидиомицеты могут быть использованы для получения биомассы с высоким содержанием белка, ненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой), витаминов, минеральных веществ, что может рассматриваться не только как белковая пищевая добавка, но и как комплексный источник биологически активных соединений. Получение биомассы мицелия базидиальных грибов методом глубинного культивирования на молочной сыворотке было рассмотрено в работах В.Ф. Колесниковой и Д.А. Пцкиаладзе и Е.А. Мельниковой с соавторами (Morin et al. 2012). Авторы успешно применили отъемно-доливной метод культивирования и показали перспективность использования грибов для получения белкового продукта.

В целом, оценка биологически ценных продуктов, ферментативной активности и аминокислотного состава грибов *Pleurotus ostreatus* и *Agaricus bisporus*, выращенных на отходах бродильной промышленности,

показала, что многотоннажный местный отход бродильного производства –после спиртовая барда является полноценным субстратом для выращивания базидиомицетов с целью получение продуктов пищевого и кормового назначения.

Список литературы

1. Chang S.T. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. Int. J. Med. Mushrooms. 1999. V. 1. P. 291–300. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v1.i4.10

2. Akhmedova Z.R. Cellulolytic, xylanolytic and lignolytic enzymes of the fungus *P. ostreatus*. Appl. Biochem. Microbiol. 1994. V. 30. P. 42–48.

3. Mirjam A., Kabel I., Jurak E. et al. Occurrence and function of enzymes for lignocellulose degradation in commercial *Agaricus bisporus* cultivation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101 (11). P. 433–436.

4. Kerrigan R.W. Global genetic resources for Agaricus breeding and cultivation. Can. J. Bot. 1995. V. 73. P. 973–979. https://doi.org/10.1139/b95-347

5. Kolesnikova V.F., Ptskialadze D.A. Method for obtaining protein biomass. Patent RU 2126835 C12P 21/00, C12N 1/14, C12N 1/14, C12R1: 645 dated 02.27.1999.

6. Ten Have R., Teunissen P.J. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. Che*m. R*ev. 2001. V. 101. P. 3397–3413. https://doi.org/10.1021/cr000115l

7. Callac P., Theochari I., Kerrigan R.W. The germplasm of *Agaricus bisporus*: main results after ten years of collecting in France, in Greece, and in North America. Acta Hortic. 2002. V. 579. P. 49–55. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.579.4

8. Melnikova, E.A., Mironov P.V., Litovka Yu.A. Morphological features of the basidiomycete *Pleurotus pulmonarius* in surface and merged culture. Bioresour. Technol. 2008. V. 99 (12). P. 5165–5176.

9. Wood D.A. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. J General Microbiol. 1980. V. 117. P. 327–328.

10. Hofrichter M., Kellner H., Pecyna M.J. et al. Fungal unspecific peroxygenases: heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome P450 properties. Adv. Exp. Med. Biol. 2015. V. 851. P. 341–368. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2_13

11. Akhmedova Z.R. Bioconversion of cotton waste by wood-destroying basidiomycetes. Microbiology. 1995. V. 64 (3). P. 381–386.

12. Akhmedova Z.R. Ligninolytic, xylanolytic and cellulolytic enzymes of basidiomycetes and their relationship in the decomposition of lignocellulose: Doct. Biol. Thesis abstract. Tashkent, 1999.

13. Akhmedova Z.R., Beletskaya O.P. Cellulases and ligninases of basidiomycetes. Prikladnaya bikhimiya i mikrobiologiya. 1993. N 6. P. 823–828 (in Russ.).

14. Rabinovich M.L., Melnik M.S., Bolobova A.V. Wood-destroying fungi. Biokhimiya. 2002. V. 67 (8). P. 1026–1050 (in Russ.).

15. Feniksova R.V., Tiunova N.A., Rodionova N.*A. e*t al. Methods of modern biochemistry. Nauka, Moscow, 1975 (in Russ.).

16. Biryukov V.V., Bitteeva M.B., Cherkezov A.*A. e*t al. Patent RU 2186851 C12P 21/00, C12N 1/14, C12N 1/14, C12R1:645 dated 10.08.2002 (in Russ.).

17. Bitteeva M.B., Biryukov V.V., Cherkezov A.*A. e*t al. Method for obtaining protein biomass of the fungus. Patent RU 2189395 C12P 21/00, C12N 1/14, C12N 1/14, C12R1: 645 dated 09.20.2002. (in Russ.).

18. Patyshakuliyeva A., Post H., Zhou M. et al. Uncovering the abilities of *Agaricus bisporus* to degrade plant biomass throughout its life cycle. Envir. Microbiol. 2015. V. 17. P. 3098–3109. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12967

19. Morin E., Kohler A., Baker A.R. et al. Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. PNAS USA. 2012. V. 109. P. 17501–17506. https://doi.org/10.1073/pnas.1206847109

РАСТИТЕЛЬНЫЕ СУБСТРАТЫ КАК ИСТОЧНИК ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ В УСЛОВИЯХ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ЗОН

Смирнов А. Н., Смирнова О. Г., Васильченко В. В.
РГАУ МСХА имени К. А. Тимирязева, Москва

Урбанизация – причина снижения иммунитета человека и теплокровных животных, сопротивляемости развития микозов на самых различных субстратах. По мере роста населения, увеличения машинного парка и интенсификации производств эта проблема в настоящее время только усугубляется (Седойкина, Коровина, 2022).

В наших различных исследованиях установлено, что встречаемость, вредоносность и фитосанитарный риск микозов, вызываемых условно-патогенными грибами, на различных растениях повышается на протяжении последних 5-10 лет. В опасные зоны попадают территории различных городов, поселков городского типа и прилегающих территорий сельскохозяйственного назначения (Рекомендации ВОЗ, 2009).

Цель настоящего исследования – сделать обзор некоторых случаев и ситуаций по исследованным нами микозам, связанных с санитарными

рисками для населения.

Материалы и методы. В работе использованы данные по микологическим обследованиям посадок картофеля разных сортов а также лип на территории РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева и московских парковых комплексов в 2014-2022 гг. Учет бесполых структур грибных патогенов проводили по разработанным методикам (Смирнов, Кузнецов, 2006; Смирнов и др., 2019). Кроме того, в этот период в Москве проводили исследования различных помещений, развитие микозов в которых провоцировались внешними факторами (заливами, разгерметизациями конструкций и т.д.).

Результаты.

Сопряженное трахеомикозное увядание картофеля (СТУК). При контрастных погодных условиях патокомплекс, состоящий в основном из грибов родов *Fusarium* и *Alternaria*, вызывая сопряженное трахеомикозное увядание картофеля, способен к началу третьей декады июля полностью уничтожить надземную часть растений картофеля и снизить его урожайность не менее, чем на 50%. При резких колебаниях температуры и влажности, когда ГТК изменялся от 1,7 до 0,1, на картофеле активно развивался альтернариоз и способствовал развитию фузариозного увядания, приводящего к гибели надземной массы растений картофеля и снижению урожайности до 10 т/га. Это очень низкий уровень урожайности (Смирнов и др., 2018; Приходько, Смирнов, 2019).

Количество конидий данных возбудителей было различным. В эпифитотийные годы оно достигало на мм2 пораженной поверхности 800-900 (с учетом микроконидий) и 100-150 штук видов родов *Fusarium* и *Alternaria* соответственно (Смирнов и др., 2018; Приходько, Смирнов, 2019). Эти показатели соответствовали бесполой стратегии размножения с высокой интенсивностью (рангом) инфекционной нагрузки.

Принципиально важно, что по агрессивности, выявленной в том числе и на универсальных восприимчивых субстратах, грибы данных родов характеризовались высокими индексами агрессивности (Васильченко, 2020).

Также примечателен факт, что фоновые условно-патогенные грибы (в том числе аспергиллы и пенициллы) довольно часто выделяли с клубней после хранения в течение до полугода, особенно если материнские растения в течение вегетации обрабатывали микроудобрения и биопрепаратами (Смирнов и др., 2019)

Фоновые микозы на стволах, боковых побегах и листве древесных культур. Здесь выявлено большое разнообразие таксонов грибов при преобладании инфекционной нагрузки грибов родов *Alternaria* и

Cladosporium, интенсивность образования их конидий достигала до 50-100. Многие из них обнаруживали и в растительных остатках и почве приствольных кругов, хотя грибы рода *Alternaria* встречались там значительно реже (Смирнова, Смирнов, 2017; Смирнов и др., 2019). В последние годы эти данные расширяются и находят все новые независимые подтверждения для плодовых и декоративных древесных культур Московского региона (Антоненко, Зубков, 2023).

Аспергиллез почек и коры декоративных лип и кленов. В микологических исследованиях отдельных образцов данных культур доминировали грибы рода *Aspergillus* (*Aspergillus niger* и другие виды). Интенсивность образования головчатых спороношений и конидий достигала до 55 и 3000 штук на мм2 пораженной (усохшей) поверхности соответственно (Смирнов и др., 2019).

Тиростромоз липы. Долгое время тиростромоз липы рассматривался как опасное но в целом фоновое заболевание, сдерживаемое урбанизированной средой. Однако к 2022 г. на фоне значительного увеличения крупномерных и иных посадок декоративных лип европейского происхождения количество конидий Thyrostroma compactum достигло до 150 штук на мм2 пораженной (усохшей) поверхности. При этом возможное медицинское значение и санитарного данного гриба нам не известны, особенно при столь критичной инфекционной нагрузке. Есть основания полагать, что учитывая морфологическое сходство бесполых структур Thyrostroma compactum, например, с конидиями альтернариеподобными грибами (гифомицетами), эти риски вполне возможны и подлежат специальному изучению в соответствии с рекомендациями, алгоритмами и протоколами ВОЗ (Смирнова, Смирнов, 2022).

Микозы техногенных и антропогенных конструкций и субстратов. В целом, условно-патогенные грибы по представленности, встречаемости и значению занимают очень существенные позиции на техногенных и антропогенных конструкциях и субстратах (Саттон и др., 2001; Рекомендации ВОЗ, 2009: Смирнов и др., 2015). Здесь выделяются грибы родов *Alternaria* (и альтернария-подобные гифомицеты) *Cladosporium*, *Phoma* (и фомоидные пикнидильные грибы), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybortrys* и *Fusarium*. Среди данных инфекций принципиальное значение имеют кормовые микотоксикозы (Маннапова, 2018).

Обсуждение результатов.

Полученные данные свидетельствуют о возможности самых разнонаправленных переносов пропагул условно-патогенных грибов (некротрофов, факультативных паразитов) в урбанизированных условиях с учетом основных типов субстратов (схема 1).

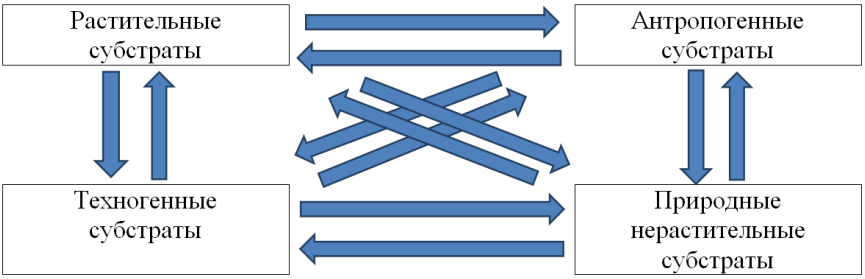


Схема 1. Принципиальные источники и пути передачи инфекционных структур (пропагул) условно-патогенных грибов.

Одинаковая родовая принадлежность данных грибов прослеживается достаточно четко. Видовую и штаммовую принадлежность широкоспециализированных грибов подлежит уточнению, с учетом молекулярно-генетических подходов и методов. Но надо иметь в виду микроэволюционные возможности данных грибов. С одной стороны, эукариотный геном дает значительные биологические возможности. С другой стороны, грибы сохраняют значительные микроэволюционные возможности (вегетативная совместимость, половая рекомбинация, транспозоны, дрейф генов и др.), которую позволяют оперативно приспосабливаться и заселять новые субстраты, особенно при снижении уровня их сопротивляемости (Седойкина, Коровина, 2022).

Прослеживаются два критерия возможности эффективного переноса условно-патогенных грибов на субстратах с пониженной сопротивляемостью. Первый – способность давать значительные пики инфекционной нагрузки в виде высокой интенсивности образования пропагул. Второй – проявление на высоком уровне агрессивных свойств.

Заключение. Перспективы будущих исследований. Фитопатология не может быть обособленным направлением, независимой от других дисциплин. В настоящем она все в большей и большей степени становится наукой об общественном здравоохранении. Растительные субстраты способны быть источниками инфекции для оппортунистических медицинских, ветеринарных и техногенных микозов, фитосанитарные и санитарные риски смыкаются.

В настоящем, чтобы добиться стабильного функционирования и благополучия урбоэкосистем, необходимо внедрять и проводить комплексные интегрированные подходы, учитывая механизмы изменчивость и огромный биопотенциал условно-патогенных грибов.

Список литературы

1. Антоненко В. В., Зубков А. В. Распространённость микромицетов родов *Alternaria* и *Cladosporium* в условиях урбанизированной среды на примере города Москвы. Плодоводство и ягодоводство России. - 2023. Т. 72. – С. 62-70.

2. Васильченко В. В. Проявление агрессивности на листьях пеларгонии в лабораторных условиях. Современная микология в России. - Т. 8. - С. 304-305.

3. Маннапова Р. Т. Микробиология и микология. Особо опасные инфекционные болезни, микозы и микотоксикозы.М:Проспект, 2018. – 384 с.

4. Приходько Е. С., Смирнов А. Н. Вредоносность патокомплекса *Fusarium – Alternaria* в посадках картофеля. Картофель и овощи. – 2019. – №7. – С. 14–15.

5. Рекомендации ВОЗ (Всемирной организации здравоохранения) по качеству воздуха в помещениях. Сырость и плесень. Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро, 2009, 252 с.

6. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. – М,:Мир, 2001. – 468 с.

7. Седойкина А. С., Коровина О. Б. Проблемные вопросы инженерно-экологических изысканий при прохождении государственной экологической экспертизы // Материалы Общероссийской научно-практической конференции «Инженерно-экологические изыскания нормативно-правовая база, современные методы и оборудование», г. Москва, 16 сентября 2022 г. - С. 9-14.

8. Смирнов А. Н., Кузнецов С. А. Определение стратегий размножения и жизнеспособности полевых популяций *Phytophthora infestans*. Защита и карантин растений. – 2006. – № 9. – С. 30-31.

9. Смирнов А. Н., Кузнецов С. А., Зайцев Д. В. Некоторые элементы микобиоты на конструктивных элементах и поверхностях помещений различного назначения // Современная микология в России. Материалы III международного микологического форума. – М., 2015. –Том 4. – Вып. 3. - С. 300-301.

10. Смирнов А. Н., Приходько Е.С., Смирнова О.Г. Проявление, возможные причины и экологические следствия вспышки фузариоза клубней картофеля после двух месяцев хранения. Успехи медицинской микологии – Т.20–2019–С.586–593.

11. Смирнов А. Н., Приходько Е. С., Васильченко В. В., Хохлов В. П., Сухоруков А. А., Кузнецов С. А. Прикладное значение определения

репродуктивного потенциала и агрессивности грибных и псевдогрибных патогенов картофеля и томата. Картофель и овощи. – 2019. – № 6. – С. 18-24.

12. Смирнов А. Н., Приходько Е. С., Хохлов В. П., Бибик Т. С. Комплекс *Fusarium – Alternaria* как универсальный вызов. Успехи медицинской микологии. – 2018. - Т. 19. – С. 62-65.

13. Смирнов А. Н., Смирнова О. Г., Горбаневский А. М., Зайцев Д. В., Чебаненко С. И. Сравнение родового состава возбудителей микозов, ослабленных древостоев, почв под ослабленнми древостоями, завезенных грунтов и урбосферы Москвы. Успехи медицинской микологии. – 2019. – Т. 20. – С.581-585 (Материалы конференции «Социально-значимые микозы», 11-12 апреля 2019 г., г. Москва).

14. Смирнов А. Н., Смирнова О. Г. Тиростромоз липы в условиях урбанизированной городской среды. Биосфера.. – 2022. – Т. 14. - №4. С. 404-406.

15. Смирнов А. Н., Смирнова О. Г. Тиростромоз – опаснейшее заболевание липы в условиях Москвы. Современная микология в России. - 2022. - Том 9. Материалы 5-го съезда микологов России. С. 317-320.

16. Смирнова О. Г. Смирнов А. Н. Микозы древостоев как одна из основных причин их ослабления и массового падения в Москве летом 2016 г. Современная микология в России. Материалы четвертого съезда микологов России. – Москва, 2017. – Том 6. – С. 269-270.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ХИЩНЫМ ГРИБАМ-ГИФОМИЦЕТАМ В ГНЦ ВБ ВЕКТОР РОСПОТРЕБНАДЗОРА (КРАТКИЙ ОБЗОР)

Теплякова Т.В., Белая Т.Д. Ставский Е.А., Петровская И.Ф.
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Хищные грибы-гифомицеты скрыты от глаз многих микробиологов, хотя эти несовершенные грибы обитают в почве повсеместно и регулируют численность нематод, круглых микроскопических червей. Механизм хищничества, возникший в результате длительной эволюции, независимо от типа ловушки (клейкие петли, сжимающиеся кольца, клейкие головки и т.д.), включает: выделение аттрактивных и токсичных веществ, проникновение гифы гриба внутрь тела парализованной нематоды, выделение ферментов и антибиотиков для утилизации нематод и предотвращения развития конкурирующих микроорганизмов. Эти грибы составляют особую экологическую группу, роль которой в

круговороте углерода, азота и других важных элементов, входящих в состав огромной биомассы почвенных нематод, трудно переоценить.

Наибольшую роль в механизме хищничества у нематофаговых грибов играют токсины сесквитерпеновой природы, растворенные в клейком веществе, выделяющемся на поверхность улавливающих приспособлений [1]. Эти соединения слабо растворимы в воде, но извлекаются из биомассы хлористым метиленом и другими растворителями [2]. На примере штамма *Duddingtonia flagrans* F-882 показано, что в глубинной культуре происходит постепенное накопление аттрактивных веществ. Методами хромато-масс-спектрометрии было идентифицировано вещество с наибольшей аттрактивностью для тест-нематоды *Panagrellus redivivus*, это оказался сесквитерпеновый альдегид 3,7,11-триметил-додека-2,4,6,10-тетраеналь [3].

Хищные грибы и растительные нематоды. Экологическими исследованиями было показано, что численность популяции хищных грибов, помещенных в почву, стабилизируется за счет их способности не только выживать, но и размножаться хламидоспорами, что позволило обосновать способы получения и применения препаратов. Обнаружена периодичность в формировании ловчих органов хищных грибов в природных условиях. Выявлены штаммовые различия по их отношению к фунгистазису почвы. Приведены новые сведения о явлении микофилии в жизнедеятельности хищных грибов и разработаны способы обнаружения и очистки штаммов от грибов - микофилов при их выделении из природных условий и хранении в коллекциях. Выделен из почвы высокоэффективный штамм хищного гриба *A. oligospora* ВКМF-3062Д, снижающий численность нематод в почве на 86%. Разработан технологический регламент производства препарата «нематофагин» на основе спорово-мицелиального комплекса в условиях твердофазной ферментации (для биолабораторий), а также способ получения биопрепарата на основе мицелия глубинной культуры хищного гриба. На основе результатов экологических исследований разработаны стратегии применения биопрепаратов, позволяющие осуществлять их эффективное использование в нескольких культурооборотах. Позднее был выделен из почвы штамм *Arthrobotrys oligospora*, который может поражать яйца в цистах картофельной нематоды *Globodera rostochiensis* [4].

Гельминты животных и человека. Нематофаговые грибы проявляют высокую нематицидную активность в отношении личинок гельминтов животных. В экспериментах, проведенных in vitro, нами получены результаты, подтверждающие наличие ларвицидных свойств у гриба *D. flagrans* F-882 в отношении стронгилят овец, лошадей и маралов.

Установлена способность хламидоспор гриба проходить через пищеварительную систему мышей, кроликов и овец, не утрачивая способности улавливать и уничтожать личинок нематод [5-7].Показано, что в лабораторных экспериментах глубинная культура хищного гриба *D. flagrans* F-882, содержащая 4-х суточный мицелий гриба, сокращает численность личинок элафостронгилюсов марала в 123,6 раза по сравнению с контролем. Нематофаговая активность данной препаративной формы составляет 99,3% [7].

Ларвицидная эффективность глубинной культуры *D. flagrans* F-882 в отношении личинок стронгилят ЖКТ и дыхательной системы овец составила 92,4 и 99,4% соответственно [8].

Широкий спектр биологически активных веществ (БАВ) в биомассе хищных грибов и отсутствие токсичности для животных указывают на потенциальную возможность разработки противопаразитарных препаратов медицинского назначения. Особую актуальность представляет поиск эффективного и нетоксичного для человека препарата против описторхоза, вызываемого паразитическими плоскими червями *Opisthorchis felineus*. Лабораторное исследование влияния метаболитов хищных грибов с сетчатыми ловушками из родов *Arthrobotrys* и *Duddingtonia* на разные стадии развития паразитической трематоды *O. felineus* показало, что яйца и личинки стимулируют рост мицелия хищных грибов и формирование ловчих приспособлений. При помещении личинок описторхов в жидкость из растертого до неклеточного состояния мицелия наблюдалось их обездвиживание, на 2-е сутки отмечалась деструкция их внутреннего содержимого, представлявшего собой зернистую бесформенную массу [9].

Противовирусные свойства хищных грибов. Проведены исследования токсичности и противовирусной активности экстрактов водного и этанольного извлечений БАВ из биомассы глубинной культуры хищного гриба *D. flagrans* F-882 [10]. Установлено, что оба экстракта малотоксичны для культуры клеток Vero и подавляют в той или иной степени размножение ДНК-геномных вирусов на данной клеточной линии. При этом этанольный экстракт гриба по сравнению с водным обнаруживает более выраженную противовирусную активность in vitro в отношении вируса простого герпеса 2-го типа, вируса эктромелии и вируса осповакцины (индексы нейтрализации этих вирусов под действием этанольного экстракта составляли 1,8; 2,6 и 3,1 lg соответственно). Экстракты культивируемого мицелия гриба *D. flagrans*, содержащие комплекс БАВ, могут стать основой для создания противовирусных лекарственных средств широкого действия в отношении ДНК-геномных вирусов [11].

В эксперименте по скармливанию зернового мицелия на основе эффективного штамма хищного гриба *D. flagrans* F-882 мышам аутбредной популяции ICR установлено, что в опытной группе мышей, получавших гриб на зерне до и после заражения 10 ЛД50 высокопатогенным вирусом гриппа птиц субтипа A/H5N1, выжило 80% животных, что достоверно отличалось от группы контроля, в которой процент выживших животных составил 16,7. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей в опытной группе была также достоверно выше СПЖ мышей в контроле (14,90±2,30 и 10,25±2,70 соответственно). Это открывает перспективы получения кормовых добавок для птицы с целью профилактики появления и распространения высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц, опасных и для человека [12]. Экстракты из мицелия *D. flagrans* F-882 эффективны не только против вируса гриппа, но и простого герпеса 2 типа [13].

Противоопухолевое свойство хищных грибов. Впервые был обнаружен противоопухолевый эффект экстракта мицелия хищного гриба *D. flagrans* F-882 на подкожные ксенографты клеток С33а карциномы шейки матки человека. Было установлено, что последовательное введение экстракта F-882 подкожно и интратуморально значительно замедляет рост ксенографтов даже после окончания инъекций и увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных на 6 недель. При этом показатель ТРО (торможение роста опухоли) в период наблюдения последовательно увеличивался, за 3 недели изменившись со значения в 45,8% до 58,7%, что позволяет предположить накопительное действие вводимой субстанции [14].

Таким образом, на основе эффективных штаммов хищных грибов могут быть получены препараты с противогельминтными, противовирусными и противоопухолевыми свойствами, которые найдут свое применение в ветеринарии и медицине.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ГЗ-29/21 ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Список литературы

1. Беккер З.Э. Терпеновый обмен грибов из родов Trichothecium и *Arthrobotrys* и гипотеза механизмов хищничества и микопаразитизма. Изв. АН Туркм. ССР. 1972; № 6: 28-33.

2. Теплякова Т.В. Биоэкологические аспекты изучения и использования хищных грибов-гифомицетов. Новосибирск, 1999: 252 с.

3.Ананько Г.Г., Теплякова Т.В., Ткачев А.В. Идентификация аттрактантов для нематод, продуцируемых хищным грибом *Duddingtonia flagrans*. Современная микология в России: Материалы 3-го Съезда микологов России. М.: Нац. акад.

микол., 2012; 3: 62.

4.Теплякова Т. В. Научные основы эффективного использования хищных грибов-гифомицетов в борьбе с паразитическими нематодами растений. Садоводство и виноградарство. 2019; 1:43-56.- doi: 10.31676/0235-2591-2019-1-43-56

5.Теплякова Т.В., Ефремова Е.А., Рябчикова Е.А. Хищные грибы гифомицеты – естественные регуляторы численности паразитических нематод животных. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2004; (4): 13 – 17.

6.Теплякова Т.В., Ефремова Е.А. Грибы гельминтофаги – регуляторы численности паразитических нематод. Сб. научн. тр. ВНИИВЭА, Тюмень, 2005; 49: 139 – 145.

7. Ефремова Е.А., Теплякова Т.В, Ананько Г.Г. Лярвицидные свойства глубинной культуры хищного гриба *Duddingtonia flagrans* при элафостронгилезе маралов. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, Новосибирск, 2007; (6): С.87 – 92.

8. Ефремова Е.А., Теплякова Т.В. Влияние глубинной культуры хищного гриба *Duddingtonia flagrans* на численность личинок стронгилят желудочно-кишечного тракта овец. Российский паразитологический журнал, 2010; (3): С.33 – 38.

9. Теплякова Т.В., Горячковская Т.Н., Вишнивецкая Г.Б. Нематофаговые грибы против гельминтов человека. Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения: Материалы XI съезда Всеросс. научно-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. 2017: 449.

10. Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Мазуркова Н.А., соавт. Противовирусное средство на основе штамма нематофагового гриба *Duddingtonia flagrans* F-882. Патент РФ № 2475531. Опубл. 20.02.2013, Бюл. № 5.

11. Ибрагимова Ж.Б., Ананько Г.Г., Костина Н.Е.Б соавт. Токсичность и противовирусная активность экстрактов глубинного мицелия нематофагового гриба *Duddingtonia flagrans* в культуре клеток Vero. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015; 160 (8): 212 – 215.

12. Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А., Ефремова Е.А., соавт. Противопаразитарная и противовирусная активность хищных грибов гифомицетов Успехи медицинской микологии. -Т. 19. -М.: Нац. акад. микол. 2018. -С. 245-249.

13. Филиппова Е. И., Ибрагимова Ж. Б., Макаревич Е. В., соавт. Противовирусные свойства экстрактов из культивируемого мицелия нематофагового гриба *Duddingtonia flagrans* F-882 в отношении вирусов гриппа А и простого герпеса // Биофармацевтический журнал. 2020. Т. 12. № 5. С. 37-44.

14. Соловьева О.И., Завьялов Е.Л., Теплякова Т.В., соавт. Эффект экстракта мицелия *Duddingtonia flagrans* на подкожные ксенографты клеток С33а карциномы шейки матки человека. Сибирский онкологический журнал. 2020; 19(6): 93–98. – doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-6-93-98.

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОМИЦЕТОВ – ДЕСТРУКТОРОВ БИОПЛАСТИКОВ

***Тертышная Ю.В.*[1,2], *Подзорова М.В.*[1,2]**
[1]*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва*
[2]*РЭУим. Г.В. Плеханова, Москва*

Современные тенденции применения полимеров направлены на использование экологичных безопасных высокомолекулярных соединений. Биопластики способны заменить традиционные полимеры в упаковочной промышленности, в медицине, в специфических технологиях. Биоразлагаемые полимеры могут быть хорошей альтернативой нефтеполимерам благодаря разрушению до углекислого газа и воды в окружающей среде, нетоксичности и экологичности [1]. В последние годы наметился рост публикаций, касающихся биопластиков. В научных работах изучаются структурные особенности, свойства и возможность применения биоразлагаемых полимеров и композиций на их основе [2, 3]. Наиболее перспективные биопластики и области их применения представлены в таблице 1.

Таблица 1. Биопластики и области их применения.

Название полимера	**Получение**	**Область применения**
Поли-3-гидроксибутират	Биомасса бактерий. Сырьем служат отходы сельскохозяйственного производства.	Упаковочный материал, медицинские изделия, системы доставки лекарств, операционные нити
Полилактид	Молочная кислота. Сырьем служат отходы сельскохозяйственного производства.	Упаковочные материалы, материалы для 3D печати, волокнистые матрицы, биоконтейнеры
Сополимер молочной и гликолевой кислоты	Молочная и гликолевая кислота. Сырьем служат отходы сельскохозяйственного производства.	Ортопедические имплантаты, волокнистые матрицы, медицинские изделия, пищевые технологии
Поликапролактон	Химический синтез	Наномедицина, биодеградируемые пленки, волокнистые материалы, тканевая инженерия, ортопедические протезы
Полибутиленсукцинат	Химический синтез	Медицинские изделия, системы доставки лекарств, упаковочные материалы, мульчирующие пленки

Поскольку мономеры являются природными продуктами, которые синтезируются и разлагаются различными организмами, биопластики также могут подвергаться метаболизму различными группами микроорганизмов. Как правило, разложение биопластика осуществляют бактерии и плесневые грибы. Опубликовано множество исследовательских работ и обзоров о разложении биопластика бактериями, тем не менее, исследования по разложению биопластиков под действием грибов недостаточно хорошо изучены. Известно, что грибы играют ключевую роль в разложении природных продуктов, таких как целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин, исследована способность различных видов микромицетов к разложению биопластиков [4].

Биодеградация биопластиков осуществляется бактериями и грибами, которые являются наиболее распространенными микроорганизмами в каждой экосистеме, включая свалки, осадки сточных вод, речные и озерные отложения, компост, лесную и луговую почву, садовую и сельскохозяйственную почву. Микробиота обладает уникальным потенциалом разрушать как природные, так и синтетические полимеры. Более 140 видов микроорганизмов, включая бактерии, актиномицеты и грибы, могут разлагать различные типы биопластиков и широко распространены в различных средах. Было проведено множество исследований для выявления тех видов грибов, которые обладают способностью разлагать биопластики [5, 6] Эти виды грибов или их метаболические ферменты могут быть использованы в качестве активных деструкторов для разрушения полимерных биоматериалов.

Несколько видов грибов, разлагающих биопластики, принадлежат к родам *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Fusarium*, *Pseudozyma*, *Penicillium*, *Trichoderma* и другие были выделены из различных экосистем (почвенных, компостных и водных) и впоследствии охарактеризованы на предмет их способности к биоразложению [7, 9]. Схема действия микроорганизмов на полимеры начинается с поверхностного контакта и биологической адгезии и заканчивается разрушением материала и образованием биомассы (рисунок 1). Механизм биодеградации полилактида, полигидроксибутирата и других полимеров изучался исследователями по всему миру. Было установлено, что биодеградация биопластика штаммами грибов, приводит к выделению природных неорганических и органических соединений, не оказывающих негативного воздействия на природную среду.

Методами молекулярного анализа также было подтверждено, что процесс биодеградации не оказывает негативных воздействий на микробное разнообразие или циклы азота и других питательных

веществ в почве [9]. Процесс деградации биопластика протекает

Рис. 1. Схема биодеградации.

при определенных условиях температуры, света и влажности и может занимать много времени. Например, полная биодеградация полилактида в природе занимает от 6 до 24 месяцев [10, 11]. Однако другие биопластики более восприимчивы к микробиоте и их деградация протекает при более низкой температуре и гораздо быстрее, чем процесс разрушения полилактида.

Поскольку все биологические процессы протекают под действием ферментов, биодеградация биопластика осуществляется эстеролитическими ферментами: эстеразами, липазами, кутиназами, протеазами.

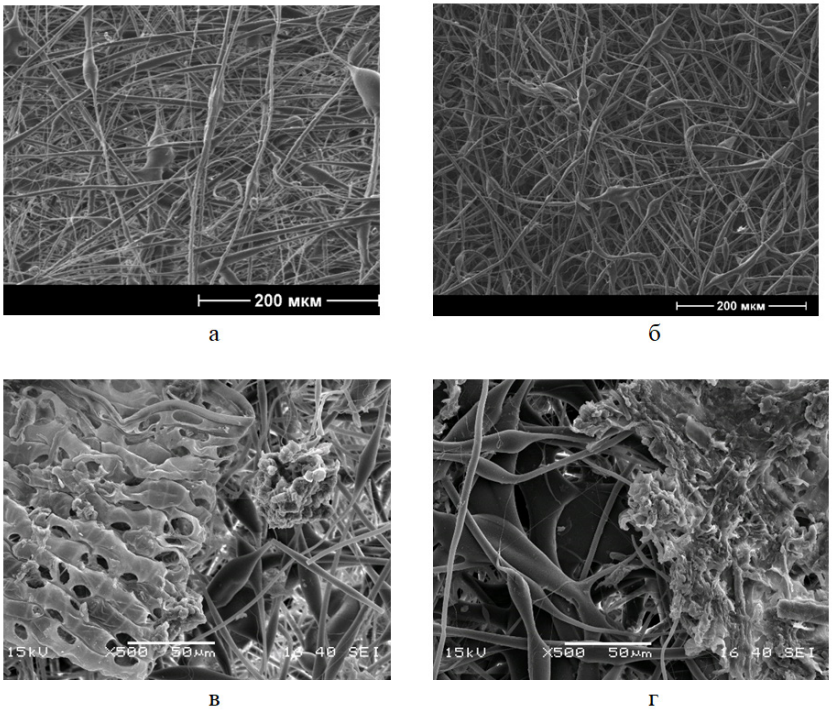
Наиболее активными деструкторами для биопластиков являются:

Поли-3-гидроксибутират: *Penicillium funiculosum*, *Penicillium pinophilium*, *Aspergillus niger*, *Mucor sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp. Gongronella butleri*, *Acremonium recifei*.

Полилактид: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium roqueforti*, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma sp.*, *Cryptococcus sp.*

Поликапролактон: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium dupontii*, *Penicillium argillaceum*, *Thermoascus aurantiacus*, *Achromobacter sp.*, *Candida cylindracea*, *Fusarium sp.*

Полибутиленсукцинат: *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium sp.*, *Purpureocillium*, *Thermoascus aurantiacus*.
Сополимер молочной и гликолевой кислоты: *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium verrucosum*, *Thermomyces laniginosa*.
Биодеградация композиционных материалов на основе рассматриваемых биопластиков зависит от количества и природы второго компонента. В работе [12] были получены и исследованы волокнистые материалы состава: полилактид- натуральный каучук. Содержание каучука варьировалось от 5 до 15 мас.%, процесс биодеградации изучали в почве в лабораторных условиях при температуре окружающей среды в течение 220 дней. Выделение почвенных микромицетов проводили методом серийных разведений на плотных питательных средах. Были определены микромицеты рода *Aspergillus*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*



а б в г

Рисунок 2. Микрофографии волокнистых материалов полилактид-натуральный каучук составов 90/10 мас.%, исходный образец (а) и после деградации в почве (в) и 85/15 мас.% исходный (б) и после деградации

в почве (г).

После биодеградации в почве наблюдаются значительные изменения в структуре материала: хрупкое разрушение единичных волокон, рыхлость поверхности, объемные домены, образованные микроорганизмами (рисунок 2). Следует отметить, что меняются теплофизические и физико-механические характеристики полимеров. Разложение в почве происходит под действием воды, температуры, бактерий и выделенных плесневых грибов (*Aspergillus*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*) одновременно. Ускорение деградации таких материалов в почве может быть достигнуто за счет увеличения возможности поверхностного проникновения ферментов, т.е. за счет увеличения удельной поверхности.

Из результатов многих работ следует, что существует значительное количество микромицетов, способных разрушать матрицы биопластиков. Однако для оценки влияния продуктов распада на почвогрунт, его элементный состав и pH требуются дальнейшие исследования.

Список литературы

1. Xiao L., Wang B., Yang G., Gauther M. Poly(lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications // Biomed. Sci. Eng. Technol. 2012. 247-282.

2. Gonzalez-Lopez M.E., Campo A.S., Robledo-Ort z J.R., Arellano M., Perez-Fonseca A.A. Accelerated weathering of poly(lactic acid) and its biocomposites: A review // Polym. Degrad Stab. 2020. 179. 109290.

3. Ольхов А.А., Тертышная Ю.В., Лобанов А.В., Иорданский А.Л. Влияние комплекса Mn(III) хлор-тетрафенилпорфирина на морфологию и свойства биоразлагаемых полиэфиров // Материаловедение. 2022. № 6. С. 9-16.

4. Тертышная Ю.В., Левина Н.С., Бидей И.А. Рост плесневых грибов на волокнистых и пленочных полимерных материалах. // Успехи медицинской микологии. 2018. Т. 19. С. 80-82.

5. Kumaravel S., Hema R., Lakshmi R. Production of Polyhydroxybutyrate (Bioplastic) and its Biodegradation by *Pseudomonas* Lemoignei and *Aspergillus Niger* // Journal of Chemistry. 2010. V. 7. 148547

6. Kim M-N., Lee A-R., Yoon J-S., Chin I-J. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils // Europ. Polym. J. 2000. V. 36(8). P. 1677-1685 https://doi.org/10.1016/S0014-3057(99)00219-0

7. Pranamuda H., Tokiwa Y., Tanaka H. Polylactide degradation by an *Amycolatopsis sp.* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. 63. 1637-1640. https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1637-1640.1997

8. Tertyshnaya Yu.V., Shibryaeva L.S., Levina N.S. Biodestruction of Polylactide and Poly(3-Hydroxybutyrate) Non-Woven Materials by Micromycetes // Fibre Chem. 2020. 52. P. 43-47.
9. Adhikari D., Mukai M., Kubota K., Kai T., Kaneko N., Araki K.S., Kubo M. Degradation of Bioplastics in Soil and Their Degradation Effects on Environmental Microorganisms // J. Agricult. Chem. and Environ. 2016. V. 5(1). https://doi.org/10.4236/jacen.2016.51003
10. Richert A., Olewnik-Kruszkowska E. Enzymatic degradation of biostatic materials based on polylactide // Ecol. Quest. 2018. 29(2). P. 91-97.
11. Tokiwa, Y.; Calabia, B. P. Biodegradability and Biodegradation of Poly(Lactide) // Appl. Microbiol. Biotech. 2006. 72. 244–251. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0488-1
12. Tertyshnaya Y.V., Karpova S.G., Podzorova M.V., Khvatov A.V., Moskovskiy M.N. Thermal Properties and Dynamic Characteristics of Electrospun Polylactide/Natural Rubber Fibers during Disintegration in Soil // Polymers. 2022. V. 14. 1058. https://doi.org/10.3390/polym140510

ЗАЩИТА КОНСТРУКЦИОННЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГРИБОВ В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА С ПОМОЩЬЮ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА

Загустина Н.А.[1], Алехова Т.А.[2], Александрова А. В.[2], Башаров А.А.[3], Плотников А.Д.[3]
[1]Институт биохимии им. А.Н., Москва
[2]МГУ им.М.В. Ломоносова, Москва
[3]Ракетно-космическая корпорация «Энергия» им. С.П. Королёва, Королёв

В настоящее время планируются все более длительные полеты в космос. При длительных космических полетах на борту станции обнаруживается широкий спектр различных микроорганизмов, что приводит к необходимости контроля за микробиотой станции и оценки возможных рисков для экипажа и обрудования [1]. С 1998 г. в рамках эксперимента «Биокоррозия» проводился мониторинг микрофлоры на орбитальной станции «Мир», а затем на Российском сегменте ОС МКС в выбранных точках с поверхностей конструкционных материалов [2]. Результаты выделения и определения выделенных из проб грибов показали, что это широко распространенные космополитные виды, способные существовать в условиях минимальной влажности и доступности питания. Большинство видов них характерно для жилых и рабочих помещений, но некоторые относятся к группе биодеструкторов, например *Aspergillus niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Paecilomyces variotii*,

Penicillium chrysogenum, *P. aurantiogriseum*, *P. purpurogenum*, *Ulocladium botrytis*. Наиболее часто встречаются в пробах представители двух родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Было выделено более 50 видов мицелиальных и только 2 вида дрожжевых грибов. Наиболее обильными и часто выделяемыми видами были *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor* и *Rhodotorula glutinis*. Все выделенные микроорганизмы были идентифицированны и депонированы в коллекциях ВКМ и ВКПМ [3, 4]. Сравнение характеристик роста, а также синтеза ферментов антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы и каталазы у этих грибов со штаммами того же вида, хранящимися в коллекциях, показало, что они различались незначительно. Изучение способности этих грибов осуществлять повреждение конструкционных поверхностей из алюминий-магниевых сплавов АМг-6 и 1570 показало, что в наземных смоделированных экстремальных условиях при обрастании образцов сплавов они способны были вызывать различные виды коррозионных повреждений: образование питтингов, язв, межкристаллитную коррозию. Видами, вызывающими наиболее значительные биокоррозионные повреждения оказались: *P. chrysogenum P. aurantiogriseum*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. niger*, *Cladosporium herbarum*, *Paecilomyces variotii* и *Ulocladium botrytis* [5, 6].

Для оценки биокоррозионной активности грибов проводили инкубации образцов алюминий-магниевых сплавов в условиях обрастания в течение 3 месяцев. Затем образцы очищались от мицелия и исследовались различными методами электронной микроскопии. Оценку степени и характера биокоррозионного поражения образцов проводили с использованием оптической микроскопии, атомно силовой микроскопии, растровой и сканирующей микроскопии. Исследования показали образование на поверхности металла глубоких каверн до 300-500 мкм со сложной структурой, подповерхностное повреждение металла, возникновение межкристаллитной коррозии [7-9].

Образцы алюминиевых сплавов АМг6 и 1570С после воздействия грибов-деструкторов подвергались металлографическим исследованиям, томографированию с помощью рентгеновского томографа, механическим на растяжение и усталостным испытаниям при температуре 20°С в исходном состоянии и после биокоррозионного поражения. Результаты циклических испытаний образцов показали, что наличие биокоррозионных поражений на поверхности образцов АМг6 и 1570С приводило к снижению усталостных характеристик алюминий-магниевых сплавов [10].

Развитие микроорганизмов-деструкторов на поверхности материалов, в том числе конструкционных, при изменении влажности,

температуры, повышения содержания веществ, которые могут быть для них источниками углерода, в том числе и в атмосфере станции, могут ухудшать условия обитания космонавтов, приводить к нарушениям в эксплуатации оборудования и сказываться на безопасности полета. Все это делает необходимым мониторинг поверхностей конструкционных материалов, а также разработку эффективных способов подавления жизнедеятельности микрофлоры в условиях обитаемых отсеков станции.

Использование дезинфектантов в условиях полета затруднено, поэтому была исследована возможность изоляции от окружающей среды биологических загрязнений на ранних стадиях возможного развития повреждений. Одним из способов обезвреживания и локализации возникших загрязнений может быть простое покрытие поверхности пленками с дезинфицирующими свойствами. Пленки были сформированы из безопасных материалов, широко применяемых в пищевой промышленности, косметологии и др. областях: поливиниловый спирт, карбоксиметилцеллюлоза и сукцинат хитозана [11]. При формировании пленок в их структуру включали в качестве дезинфицирующего агента наночастицы серебра [12]. Пленки получали методом литья, высушивали и исследовали на фунгицидную и бактерицидную активности, нанося на поверхность чашек Петри, предварительно засеянных спорами грибов. Было показано фунгицидное действие таких пленок, наблюдали полное подавление прорастания спор. Результаты, полученные в лабораторных условиях, позволили провести космичекий эксперимент (КЭ), который дублировался наземным. При подготовке КЭ суспензии спор грибов и бактерий наносили непосредственно на поверхность образцов алюминий-магниевого сплава АМг6. Смоделированное на поверхности сплава таким образом смоделированное «загрязнение» суспензией клеток микроорганизмов (споры грибов, бактерии, дрожжи) покрывалось сформированными пленками. Образцы размещали в чашке Петри, запаивали во второпластовую пленку. 11 таких упаковок формировали пакет, также запаянный во второпластовую пленку, при соблюдении необходимой степени защиты. Пакет с герметизированными образцами помещали в контейнер, который в дальнейшем доставлялся на РС МКС для экспонирования.

После 4-6 месяцев полетного эксперимента, контейнер доставлялся на Землю. В наземных условиях при постоянной температуре экспонировали 2 контрольных контейнера. Контейнеры вскрывались в асептических условиях. Нанесенные на образцы АМг6 клетки смывали водой несколько раз, полученную суспензию рассевали на чашки Петри на различные среды для оценки жизнеспособности клеток под

пленками. Показано, что пленки, сформированные на основе сукцината хитозана и других испытанных полимеров с НЧ серебра при его концентрации 100 ppm оказывали фунгицидное действие в отношении испытанных грибов и дрожжей (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula sp.* и др.). Было выполнено несколько экспериментов, в ходе которых испытаны пленки с различными концентрациями НЧ серебра, полученного различными способами. Исследована их активность по отношению к различным микроорганизмам, которые были выделены с конструкционных поверхностей РС МКС. Таким образом, были подобраны безопасные полимерные материалы, которые были способны формировать пленки с фунгицидными свойствами, что позволило получать модифицированные полимеры с наночастицами серебра, полностью безопасные для применения. Кроме того, полученные полимеры с наночастицами серебра с высокой вязкостью могут быть нанесены на более прочные пленки, высушены и также использоваться для локализации загрязнений в тех случаях, когда невозможно использовать дезинфектанты и следует избегать распространение спор грибов. Испытания в течение длительного времени (6 месяцев) показали возможность полного подавления размножения грибов и дрожжей под пленками. Дальнейшие работы позволят расширить спектр испытанных бактерий и грибов, чтобы определить, насколько универсальным может быть их использование для локализации биологических загрязнений.

Список литературы

1. Новикова Н. Д. Основные закономерности формирования микрофлоры среды обитания орбитального комплекса «Мир». // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2001. Т. 34. № 4. С. 32—40.

2. Алехова Т.А., Александрова А.В., Новожилова Т.Ю., Лысак Л. В. , Загустина Н. А. , Безбородов А. М. Мониторинг микроорганизмов-деструкторов на пилотируемых орбитальных комплексах // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 435-443.

3. Алехова Т.А., Александрова А.В., Загустина Н.А., Лысак Л.В., Борисов В.А., Плотников А.Д. Космический эксперимент «Начальные этапы биодеградации в условиях космоса» с использованием укладки «Биопробы» на РС МКС // Космонавтика и ракетостроение. 2007. Т. 49. № 4. С. 108-117.

4. Алехова Т.А., Александрова А.В., Новожилова Т.Ю., Загустина Н.А. Лысак Л.В., Плотников А.Д.. Эксперимент «Начальные этапы биодеградации и биоповреждений в условиях космоса» // Вестник МГУ Сер.16. Биология. 2008. №4. С. 27-33.

5. Алехова Т.А., Александрова А.В., Загустина Н.А., Новожилова Т.Ю., Романов С.Ю. Микроскопические грибы на Российском сегменте международной

космической станции. // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. Вып. 5. С. 9-19.

6. Алёхова Т.А., Загустина Н.А., Александрова А.В., Новожилова Т.Ю., Борисов В.А., Плотников А.Д. Мониторинг начальных этапов биоповреждений конструкционных материалов, применяемых в авиакосмической технике методами электронной микроскопии //Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2007. № 7. С. 53-59.

7. Алехова Т.А., Александрова А.В., Новожилова Т.Ю., и др. Применение атомно-силовой микроскопии для мониторинга микробиологической коррозии алюминий-магниевых сплавов // Поверхность. 2005. № 1. С. 54-59.

8. Алехова Т.А., Шкловер В.Я., Загустина Н.А., Швындина Н.В., Плотников А. Д., Васильев А.Л. Электронно-микроскопические исследования повреждений поверхности алюминиевого сплава АМг6, вызванных выделенными на космических станциях микроорганизмами // Поверхность. 2010. № 9. С. 42-49.

9. Герасименко А. А. Микромицетная коррозия металлов. I. Идентификация, культивирование микромицетов, коррозионные гравиметрические исследования. /А. А. Герасименко // Защита металлов. 1998. №2. С. 192-207.

10. Плотников А.Д., Корнеева Е.Ю., Алехова Т.А., Загустина Н.А. Исследование влияния биокоррозионных поражений на механические характеристики образцов из алюминиевых сплавов АМГ6 и 1570С применительно к условиям эксплуатации российского сегмента МКС. //Космическая техника и технологии. 2017. № 4 (19). С. 35-44.

11. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317-368.

12. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы. // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 3. С. 242-269.

МИКРОМИЦЕТЫ АНТРОПОГЕННЫХ ЗОН

Зайнитдинова Л.И., Жураева Р.Н., Лазутин Н.А., Мавжудова А.М.
Институт микробиологии Академии наук РУз, Ташкент, Узбекистан

В условиях антропогенного загрязнения почвы отмечается снижение разнообразия её микробиоты, что в свою очередь затрудняет процессы самоочищения почв и провоцирует рост чужеродной микрофлоры [Артамонова В.С., 2002; Ковалева Г.В. и др., 2012]. В связи с этим возникает проблема микробиологической безопасности, решение которой требует изучения всех аспектов жизнедеятельности микробиоты антропогенно нарушенных почв. Урбаногенное воздействие, осуществляемое человеком,

затрагивает напрямую почвенную микробиоту и, в первую очередь, проявляется как изменение структуры микробного сообщества, поскольку в состав входят микроорганизмы с разной физиологической толерантностью, а также физиологией.

Надо отметить, что, многие микроорганизмы обладают различными механизмами приспособления к обитанию в экстремальных условиях, что позволяет им существовать в городских почвах, несмотря на различного рода загрязнения. Механизмы приспособления определяются не только таксономической принадлежностью микроорганизма, но и условиями среды, в которой они существуют, а также концентрациями и видами загрязнений. Поэтому видовой состав микроорганизмов в почвах с различным уровнем и характером загрязнений будет различаться, что возможно использовать в практике почвенного биомониторинга.

Антропогенные изменения в почве можно проследить, опираясь на результаты экологического мониторинга комплекса почвенных микромицетов [Терехова В.А., и др., 2006; Терехова В.А., 2007; Арчегова И.Б. и др., 2013]. На уровне грибных сообществ наиболее чувствительными к уровню загрязнения являются такие характеристики комплекса, как структура грибной биомассы, таксономическое разнообразие и доля меланизированных форм микромицетов [Терехова В.А., и др., 2015; Широких А.А. и др., 2009].

Целью данного исследования было выявление структуры сообществ и преобладающих форм микромицетов в почвах г.Ташкента и сточных водах очистных сооружений.

Проведен анализ состава микромицетов из образцов почв имеющих различную степень загрязнений и близлежащих территорий очистных сооружений г.Ташкента. Микробиологическое обследование сероземных почв, расположенных на незначительном удалении от очистных сооружений города, показало, что значительную часть выявленных микробиоценозов составляют микромицеты. Возможная причина этого — повышенная концентрация органического вещества, характерная для всех типов отобранных образцов. Среди выделенных образцов преобладали представители рода *Trichoderma*, а также представители родов *Aspergillus*, *Penicillium* (рис.1).

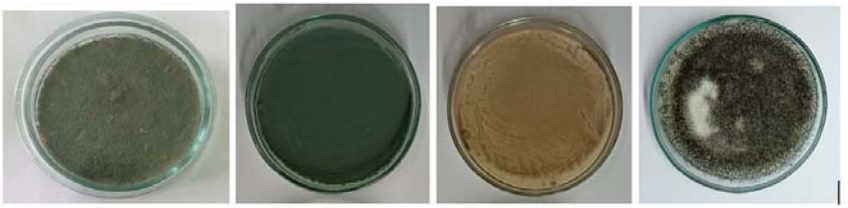


Рис. 1. Преобладающие формы микроскопических грибов сероземных почв, расположенных на незначительном удалении от очистных сооружений города (р.р.

Trichoderma (а), *Penicillium* (б) и *Aspergillus* (в, г) на среде Чапека).

Непосредственно в сбросных водах очистных сооружений в стрессовых условиях загрязнения доминировали определенные группы микромицетов. Выделенные грибы были представлены родами *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma* и *Acremonium*, причем численность микроскопических грибов рода *Aspergillus* значительно превышала остальные группы. Менее всего представлены рр. *Trichoderma* и *Acremonium* (рис.2).

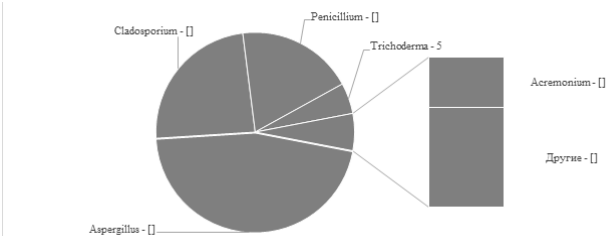


Рис.2. Структура микромицетов очистных сооружений.

В результате обследования сточных вод очистных сооружений выделены микроскопические грибы родов *Aspergillus. Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, некоторые из которых были определены до вида: *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus fumigates*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Cladosporium cladosporioides.*

Изучение культурально-морфологических особенностей отобранных штаммов показало, что при развитии микромицетов на сточных водах происходят значительные изменения в морфологии колоний и окраске воздушного мицелия. Так, при росте *Trichoderma* на стандартной среде наблюдаются характерные дерновинки с конидиеносцами, которые расположены по всей поверхности. Цвет в молодых колониях желтого цвета, переходящий в зеленый по мере роста. На среде со сточной водой воздушный мицелий развит плохо, рост в основном глубинный, наблюдается незначительное образование дерновинок с конидиеносцами (рис.3).

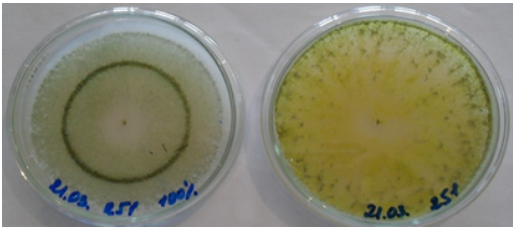


Рис. 3. Морфология колоний *Trichoderma sp.* при культивировании на среде

Чапека + сточ. вода (слева) и на стандартной среде Чапека (справа).

Изучение влияния загрязнителей на рост и развитие *Penicillium sp.* показало, что при выращивании гриба на стандартной среде Чапека-Докса наблюдается характерное для рода *Penicillium* развитие воздушного мицелия и конидиеносцев с конидиями. При росте *Penicillium sp.* на сточной воде отмечается замедление его роста и развития. Отсутствует обильное образование конидиеносцев с конидиями. Так, при росте гриба на контрольной среде, единичные конидиеносцы начинают образовываться на 2 сутки роста, на 3 сутки наблюдается обильное образование конидиеносцев с конидиями. В то время, как на сточной воде единичные конидиеносцы образуются лишь на 4 сутки роста гриба, кроме того, при выращивании на сточной воде происходит увеличение ширины гиф воздушного мицелия (рис. 4).

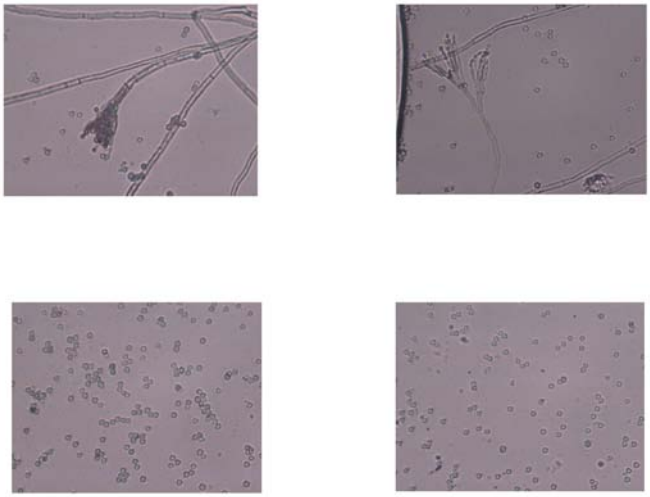


Рис. 4. Морфологические отличия в конидиеносцах и конидиях *Penicillium sp.* при культивировании на среде Чапека + сточ. вода (слева) и на стандартной среде Чапека (справа)

Таким образом, проведенные исследования микробиоценозов антропогенных зон показывают, что антропогенные изменения как в почве, так и в водных образцах можно проследить, опираясь на результаты экологического мониторинга комплекса почвенных микроорганизмов. Состояние городских территорий требует особого внимания, так как влияние антропогенных процессов на почвенную систему, приводит к изменению практически всех ее компонентов, начиная с агрохимических и физических свойств и заканчивая

микробиологическими и биохимическими показателями, приводя к появлению доминирующих форм и вызывая некоторые изменения их морфологических, и в дальнейшем, возможно и физиологических функций.

Список литературы

1. Артамонова, В.С. Микробиологические особенности антропогенно преобразованных почв Западной Сибири. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, — 2002. — 225с.
2. Ковалева Г.В., Старожилов В.Т., Дербенцева А.М., и др. Почвы и техногенные поверхностные образования в городских ландшафтах: монография - Владивосток: Изд-во Дальнаука, - 2012.-159с.
3. Терехова В.А., Арчегова И.Б., Хабибуллина Ф.М., и др. Экология и промышленность России. - 2006. - №3. - с. 34-37.
4. Терехова В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. – М.: Наука, 2007. – 215 с.
5. Арчегова И.Б., Кузнецова Е.Г., Хабибуллина Ф.М., и др. Ускоренное восстановление нарушенных территорий на севере: теоретические и прикладные аспекты // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – Москва. - № 8-2. – 2013. - с.204-206.
6. Терехова В.А., Шоба С.А. Функционирование почв в меняющихся условиях окружающей среды - М.: ГЕОС. - 2015. - 164 с.
7. Широких А.А., Колупаев А.В. Грибы в биомониторинге наземных экосистем // Теоретическая и прикладная экологияю – 2009. - No3. - с.4-14.

Глава 13

ЛЕКАРСТВА ИЗ ГРИБОВ

DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.13

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГРИБА *PENICILLIUM CAMEMBERTI*

Аккузина С.Г., Кощеева С.С.
Кировский государственный медицинский университет

Одним из самых знаменитых сыров с плесенью является камамбер. За последние пять лет наблюдается постоянно возрастающий спрос на сыры, так как отмечается постепенное снижение их стоимости. Последние исследования ученых показывают, что сыры с плесенью имеют массу достоинств и полезных свойств. Благодаря содержанию особого химического вещества спермидина, увеличивают продолжительность жизни человека, регулируют обмен веществ, способствуют выработке полезного холестерина и выведению токсинов из организма. Но на этом фоне отмечаются ограничения в употреблении сыров. Камамбер рекомендуется употреблять в небольших количествах: 50 грамм в сутки и он противопоказан беременным женьщинам и детям [1,2].

Цель исследования. Изучить влияние белой плесени сыра камамбер на резидентную микрофлору кишечника.

Задачи.

1. Овладеть методиками проведения бактериологических исследований микрофлоры

2. Выделить из сыра и изучить морфологические свойства плесневого гриба *Penicillium camemberti*.

3. Изолировать из кала белых мышей резидентную микрофлору.

4. Определить влияние гриба *Penicillium camemberti* на постоянную микрофлору кишечника белых мышей.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования выбран сыр камамбер с белой плесенью.

Использовались бактериоскопический и бактериологический методы исследования.

Мицелий гриба снимали с поверхности сыра и микроскопировали при увеличении объектива микроскопа х 40. Изготовление препарата проводили по общепринятой методике, после чегот окрашивали по Граму.

Для изучения культуральных свойств проводили посев гриба на среду Сабуро с дальнейшим культивированием при температуре 25 °С в течение 72 часов.

Антибактериальные свойства гриба устанавливались в отношении резидентной микрофлоры, выделенной из кала белых мышей: сарцины, дрожжей, бифидобактерий и кишечной палочки. Для культивирования микроорганизмов применяли питательные среды: лактобак агар, среда Эндо, мясо-пептонный агар, среды Сабуро и Бифидум. Культуры резидентных бактерий наносили сплошным микробным газоном на поверхность

питательной среды, в центре размещали плесневый гриб.

Результаты исследования. При микроскопии гриба в поле зрения микроскопа фиксировали септированные гифы, около которых находились свободнолежащие круглые споры, по Граму препарат окрасился положительно.

Характер роста *Penicillium camemberti* на среде Сабуро характеризовался образованием круглых колоний разного диаметра от 10 мм до 40 мм, серо-белого цвета с бархатистой морщинистой поверхностью, в центре присутствовало вздутие. Вегетативный мицелий гриба возвышался над питательной средой и очень крепко крепился в ней.

Кишечная палочка, выделенная из оганизма лабораторных животных, на среде Эндо росла ввиде малиновых колоний с характерным металлическим блеском. При рассмотрении мазка из колонии в поле зрения микроскопа отмечали присутствие грмотрицательных палочек с закругленными концами, расположенных в мазке одиночно беспорядочно.

Бифидобактерии (*Bifidobacterium animalis* s*pp. animalis*) кишечника на Бифидум среде дали колонии в виде гвоздиков, в мазках представляли собой короткие палочки, собранные в цепочки, грамположительные.

Характер роста кокковой микрофлора (*Sarcina flava*) при культивировании на мясо-пептонном агаре имела рост в виде гладких блестящих колоний S-формы желтого цвета. При иммерсионной микроскопии клетки круглой формы, расположение плотными скоплениями, пакетами, по Граму положительные.

Также при бактериологических исследованиях кала был выделен гриба рода Кандида; на среде Сабуро колонии молочно-белого цвета, гладкие, блестящие.

Одновременным культивированием *Penicillium camemberti* и *E. coli* на мясо-пептонном агаре отмечен слабый рост кишечной палочки, в виде мелких полупрозрачных колоний. На этой же среде *Penicillium camemberti* спровоцировал активный рост сарцины и оказал угнетающее действие на гриб Кандида – слабый рост в виде мелких колоний белого цвета.

Внесение культуры *Penicillium camemberti* на поверхность Бифидум среды с ростом бифидобактерий привело к гибели бифидобактерий.

Выводы

1. В результате изучения морфологических и тинкториальных свойств *Penicillium camemberti* установлено, что он имеет грамположительные несептированные гифы и конидиеносцы с круглыми спорами.

2. При культивировании *Penicillium camemberti* на среде Сабуро рост представлен круглыми колониями серо-белого цвета с бархатистой морщинистой поверхностью, в центре присутствует вздутие.

3. Обнаружено, что плесневый гриб *Penicillium camemberti*, использованный для производства сыра Горгонзола, угнетает рост кишечной палочки, оказывает бактерицидное действие на гриб *Candida albicans* и бифидобактерии

тонкого кишечника. Кокковая микрофлора не чувствительна к метаболитам гриба.

4. Неограниченное употребление сыра камамбер с благородной плесенью *Penicillium camemberti* способно изменить видовой состав микрофлоры и привести к развитию дисбактериоза в биотопах организма.

Список литературы

1. Захарычев В.В. Грибы и фунгициды: учебное пособие /В.В. Захарычев; - М.: Изд-во «Лань», 2020 - 272 с.

2. Лекомцева, С.А., Малозёмов, О.Ю. Особенности грибов рода *Penicillium* и возможности их использования: журнал Форум молодых ученых/ С.А. Лекомцев, О.Ю. Малоземов;- Екатеринбург: Уральский государственный медицинский университет: Научная электронная библиотека «КиберЛенинка», 2021г.

К ВОПРОСУ ОБ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКОТОКСИНА ПАТУЛИНА

Алмухтар О.А.Х.[1], Джабир М.С.[2], Цублова Е.Г.[1], Крылова И.Н.[3]

[1]Брянский государственный университет им.И. Г. Петровского

[2]Багдадский технологический университет, Ирак

[3]ПМГМУ имени И. М. Сеченова, Москва

Патулин, продуцируемый различными видами грибов *Penicillium*, был впервые выделен в 1943 г. под названием терцинин как возможное противомикробное средство. Однако выявленные мутагенное, канцерогенное, тератогенное, иммуномодулирующее и цитонекротическое действие патулина не позволили использовать его в качестве лекарственного средства. В настоящее время патулин относится к группе особо опасных микотоксинов.

В настоящей работе исследовали антибактериальные свойства патулина и наночастиц золота (НЧЗ) на культуре *S. aureus*. Было показано, что микотоксин патулин в чистом виде и виде и в комбинации с НЧЗ обладал способностью зависимым от дозы образом ингибировать развитие колонии *S. aureus*. Так, при воздействии патулина в дозах 25, 50, 100 и 200 мкг/мл наблюдалось достоверное ($p<0,05$) последовательное увеличение диаметра зоны ингибирования на 35, 98, 140 и 161% соответственно, по сравнению с контролем, принятым за 100%. НЧЗ в дозах 25, 50, 100 и 200 мкг/мл также увеличивали зону ингибирования на 60, 125, 186 и 222% соответственно, по сравнению с контролем. При комбинированном применении патулин и НЧЗ проявляли синергетический эффект, превышавший в среднем в

1,2-19 раз таковой при раздельном применении. Патулин и НЧЗ вызывали также структурные изменения бактериальных клеток. При этом в случае комбинированного применения вещества оказывали более выраженное действие на внешнюю мембрану тестируемых микроорганизмов, что проявлялось в большем количестве пор на клеточной мембране штаммов бактерий, истечением протоплазмы клеток из-за осмотического дисбаланса и последующими изменениями нормальной формы. Наблюдалось появление аномальных структур, разрывов, повреждений и пузырей на мембране бактериальных клеток. Было также установлено, что патулин и НЧЗ снижали связывание *S. aureus* клетками эмбриональных фибробластов крыс.

Таким образом, патулин обладал ярко выраженным антибактериальным действием в отношении колонии клеток *S. aureus*, что проявлялось не только в подавлении роста колонии, но и в снижении способности бактерий к инфицированию клеток фибробластов. НЧЗ также проявлял антибактериальное действие. Наиболее выраженный антибактериальный эффект наблюдался при комбинированном применении патулина и НЧЗ. Механизмы подлежат дальнейшему изучению.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИЦЕЛИЯ ЩЕТИНИСТОВОЛОСОГО ТРУТОВИКА *INONOTUS HISPIDUS*

Бадалян С.М., Гарибян Н.Г.
Ереванский государственный университет, Армения

В микофармакологии повысился интерес к гименохетовым грибам (класс *Agaricomycetes*, порядок *Hymenochaetales*), в частности представителям рода *Inonotus* (*I. andersonii*, *I. cuticularis*, *I. obliquus*, *I. xeranticus*) в качестве источника различных биоактивных соединений (полисахариды, терпеноиды, фенольные соединения и др.) с терапевтическим действием (антиоксидантное, противоопухолевое, противовоспалительное, нейрозащитное, антибактериальное, антифунгальное, антидиабетическое, кардиозащитное и др.) [Badalyan et al., 2019; Badalyan, Gharibyan, 2021].

Ксилотрофные грибы, включая гименохетовые, полипоровые, и агариковые легко выделяются и растут в культуре, что делает их удобными для биотехнологического культивирования мицелия с целью исследования биомедицинского потенциала [Badalyan, Gharibyan, 2016; 2017].

В настоящей работе исследовалась антифунгальная активность (АФА) двух армянских штаммов (Inh/1, Inh/3) щетинистоволосого трутовика *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst. Тест-организмами служили потенциально патогенные для человека и животных штаммы трех видов/штаммов микромицетов,

выделенных из почв Армении: *Chrysosporium keratinophilum* (Chk-1430), *Microsporum gypseum* (Mg-842) и *Trichophyton terrestre* (Trt-931) [Badalyan, Gharibyan 2017].

АФА мицелия *I. hispidus* исследовалась в совместной культуре на картофельно-декстрозном агаре (КДА) тремя подходами: при совместном росте колоний *I. hispidus* и тест грибов, а также воздействием культуральной жидкости (КЖ) и экстракта мицелия (ЭМ) *I. hispidus* на растущие колонии тест грибов.

Антагонистический характер взаимоотношений контактирующих колоний оценивался по специальной шкале, включающей 3 типа и 4 подтипа реакций антагонизма: А и В – взаимоторможение, соответственно при контакте и на дистанции; С – нарастание; СА1, СА2 и СВ1, СВ2, соответственно частичное и полное нарастание после контактного и дистанционного взаимоторможения [Badalyan et al., 2004].

До контакта колоний измерялась средняя скорость роста (СРсред, мм/сут) мицелия по формуле СРсред = ΔD/ΔT, где ΔD - диаметр колонии, ΔT - время. В ходе опыта описывались также морфологические изменения колоний: наличие и интенсивность пигментации мицелия и агара, образование демаркационной линии антагонизма и выделение экссудата при контакте. Наблюдения проводились ежедневно, в течение месяца, после трехнедельной инкубации колоний в темноте при 25о С, а затем в комнатной температуре в режиме день/ночь.

С целью оценки антифунгального действия внеклеточных и внутриклеточных соединений, мицелий выращивался поверхностно на жидкой среде сусло:вода (1:4, v/v) в 250 мл колбах Эрленмейера из расчета 10 инокулюмов (5мм3) на 100 мл среды. Колбы инкубировались в условиях темноты при 25о С в течение 21 суток.

Для получения экстракта мицелия (ЭМ), биомасса отделялась от КЖ фильтрованием, промывалась стерильной водой и высушивалась при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, затем экстрагировалась этанолом (1:2; v/v) в темноте в течение 24 часов при 37 С.

Для оценки АФА КЖ, образцы добавлялись в КДА (1:1, v/v), которая затем разливалась в чашки (80мм) по 25 мл. Для оценки активности ЭМ, сухие образцы разбавлялись в ДМСО для получения 4% раствора, который после добавления в КДА (50 мкл/3мл) разливался в чашки Петри (35мм) по 3 мл. Инокулированные тест грибами чашки инкубировались при 25оС. Контролем для КЖ и ЭМ, соответственно, служили КДА и КДА + 50 мкл ДМСО. АФА образцов КЖ и ЭМ оценивалась по СРсред и морфологическими изменениями колоний тест грибов, по сравнению с контролем.

Антагонистическая/антифунгальная активность штаммов *I. hispidus* при совместном росте с тест грибами проявилась исключительно реакциями

взаимоторможения А (с *C. keratinophilum* и *M. gypseum*) и В (с *T. terrestre*), которые соответственно составили 66.6 и 33.4%, что свидетельтвовало о взаимной ингибиции роста контактируюших организмов. При этом, СРсред штаммов *I. hispidus* ингибировалась до 13.25% при росте с *T. terrestre*, а СРсред микромицетов - до 6.35%. Отмечались также морфологические изменения контактирующих колоний (наличие темно-коричневой демаркационной линии и лизис края колоний микромицетов при контакте).

Образцы КЖ *I. hispidus* ингибировали СРсред микромицетов в частности *C. keratinophilum*, до 43.03%. Наблюдались атипичный, неравномерный рост и желтоватая пигментация краев колоний тест грибов. Между тем, образцы ЭМ *I. hispidus* проявили слабую АФА, ингибируя рост микромицетов до 6.08 %.

Полученные результаты указывают на наличие б льшего количества внеклеточных антимикотических метаболитов при культивировании мицелия *I. hispidus*. Дальнейшие исследования различных коллекций *I. hispidus* с тестированием высоких концентраций КЖ и ЭМ могут способствовать дальнейшему биомедицинскому использованию исследуемого лекарственного трутовика.

Список литературы

1. Badalyan SM, Gharibyan NG. 2020. Pharmacological properties and resource value of hymenochaetoid fungi (*Agaricomycetes*) distributed in Armenia: Review. Int J Med Mushrooms. 22(12): 1135 – 1146.

2. Badalyan S.M., Gharibyan N.G. 2016. Diversity of polypore bracket mushrooms, Polyporales (*Agaricomycetes*) recorded in Armenia and their medicinal properties. Int J Med Mushrooms.18 (4): 347-354.

3. Badalyan SM, Barkhudaryan A, Rapior S. 2019. Recent progress in research on the pharmacological potential of mushrooms and prospects for their clinical application. In: Medicinal Mushrooms - Recent Progress in Research and Development. Eds. D. Agrawal & M. Dhanasekaran. Springer Nature Singapore, pp. 1-70.

4. Badalyan SM, Gharibyan NG, 2017. Characteristics of mycelial structures of different fungal collections. Yerevan: YSU Press, 176 p.

5. Badalyan SM, Innocenti G, Gharibyan NG, 2004. Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. Phytopathol. Mediterranea, 43: 44-48.

ИНГИБИРОВАНИЕ *VERTICILLIUM DAHLIAE* ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩИМИ АКТИНОМИЦЕТАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ПОЧВ г. ТАШКЕНТА

Бекмухамедова Н.К.[1], Ботирова И.С.[1], Зайнитдинова Л.И.[1], Мамиев М.С.[2]

[1]Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан
[2]Ташкентский Государственный аграрный университет

Введение

Актиномицеты являются продуцентами таких вторичных метаболитов как антибиотики, стимуляторы роста растений, ингибиторы ферментов, пигменты [1,2]. Некоторые пигменты обладают антибиотическими свойствами, так что многие пигментированные микроорганизмы являются продуцентами антибиотиков. Между пигментацией и образованием вторичных метаболитов существует такая тесная корреляция, что при наличии пигментов можно с большой долей вероятности ожидать образования антибиотиков и других биологически активных веществ [3,4,5].

Способность к образованию антибиотиков является ключевой особенностью актиномицетов, стимулировавшей изучение этой группы микроорганизмов во всех странах мира. Актиномицеты продуцируют широчайший спектр антибиотиков различных групп: аминогликозиды (стрептомицин, канамицин, гентомицин), макролиды (эритромицин, олеандромицин), полиеновые (нистатин, леворин), полипептиды, актиномицины, противоопухолевые препараты и др. С каждым годом увеличивается число сообщений о новых антибиотиках, продуцируемых актиномицетами [6,7,8,9].

Много исследований посвящены изучению антибиотической активности пигментов, образуемых актиномицетами. Так, Selvameenal L. с соавторами обнаружили, что штамм актиномицета *Streptomyces hygroscopicus* sub *sp. ossamyceticus* (штамм D10), выделенный ими из почв пустыни Раджастхан в 2006 году производит пигмент желтого цвета, который обладает антибиотической активностью [10]. Неочищенный пигмент получали из штамма D10 путем твердофазной ферментации с использованием питательной среды, содержащей пшеничные отруби, с последующей экстракцией этилацетатом. Антимикробную активность сырого пигмента оценивали в отношении лекарственно-устойчивых патогенов, таких как метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*, ванкомицин-резистентный *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella sp.*.

Синтез антибиотиков характерен практически для представителей всех родов актиномицетов, в особенности, таких как *Actinomadura*,

Actinoplanes, *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Streptosporangiaceae* [11]. Особенно широко способность продуцировать антибиотики распространена среди актиномицетов рода *Streptomyces*. В математической модели, предложенной Milind G. Watve с соавторами показано, что в потенциале стрептомицеты могут производить 100000 антимикробных веществ [12].

Антагонизм оказывает большое влияние на плодородие почв. Обильно развиваясь в почве, полезные микробы-антагонисты задерживают развитие многих фитопатогенных бактерий и грибов и этим оздоравливают почву. При сравнительном исследовании актиномицетов разного систематического положения, выделенных из почв Казахстана, антагонистические свойства актиномицетов редких родов (*Actinomadura*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* и др.) в отношении фитопатогенов выражены значительно слабее. Предполагается, что это связано с их малой численностью в исследованных почвах и менее активным участием в конкуренции за субстрат. Получены новые природные антибиотики - пигменты: №2167 - антибиотик из группы хинонов, продуцируемый *Actinomadura sp.* шт. ИМиВ 2167 и голубой антибиотик-пигмент №731 (Y) из *Streptomyces sp.*, шт. ИМиВ 731, новизна которых доказана на основе сопоставления со всеми известными антибиотиками - пигментами при использовании компьютерной базы данных биологически активных веществ, разработанной Д.Верди [13].

Таким образом, можно сказать, что благодаря своим особенностям актиномицеты могут успешно конкурировать с фитопатогенными микроорганизмами в почве и, большей частью, именно образующие различные пигменты. В связи с этим, актуальной является проблема поиска новых штаммов актиномицетов, продуцирующих биологически активные вещества с широким спектром экологического влияния, обладающих антагонистическими, противовирусными, фунгицидными, антиоксидантными и фитостимулирующими свойствами, которые могут быть основой новых биопрепаратов.

Целью нашего исследования являлось определение антагонистического действия к возбудителю вертициллезных заболеваний у растений пигментообразующими актиномицетами, выделенными из различных антропогенных зон г. Ташкента.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований служили 9 местных штаммов актиномицетов родов *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, выделенные из различных антропогенных зон г. Ташкента, образующие растворимые пигменты.

Актиномицеты выращивали в течение 5-7 суток, при температуре 37 оС на питательной среде крахмало-аммиачный агар (КАА), г/л: NaNO3 - 1,0; MgSO4 - 1,0; K2HPO4 - 1,0; CaCO3 - 3,0, NaCl - 1,0, крахмал - 10,0; вода водопроводная - 1 л; pH = 6,8-7,0, агар - 20,0 [14].

Антагонистические свойства стрептомицетов изучали методом агаровых блоков [15]. Тест-культура - *Verticillium dahliae*. Для выращивания *Verticillium dahliae* использовали питательную среду Чапека, г/л: NaNO3 - 2; KH2PO4 - 1; MgSO4 - 0,5; KCl - 0,5; FeSO4 - следы, сахароза - 20, вода водопроводная - 1 л; pH 6,8-7,0. Культуру выращивали в течении 7 суток, при температуре 27 оС.

Результаты исследований

При микробиологическом обследовании почв г. Ташкента и Ташкентского вилоята нами было выделено более 40 пигментообразующих штаммов актиномицетов, которые были отнесены к родам *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*. Из выделенных пигментобразующих актиномицетов отобраны 9 штамма образующих растворимые пигменты (РП), которые окрашивали питательную среду в различные цвета от бледно-розового до темно-бурого. Проведены исследования по определению антагонистических свойств выделенных культур актиномицетов к *Verticillium dahliae* - возбудителю болезни у растений (табл.1).

Таблица 1. Антагонистическое действие пигментообразующих актиномицетов к *Verticillium dahliae*.

№	Актиномицеты	Зона отсутствия роста патогена, D=мм
1	*Nocardia sp. 8*	30± 0,2
2	*Amycolatopsis sp. 51*	20± 0,4
3	*Nocardia sp. 54*	25± 0,5
4	*Streptomyces sp. 13*	22±1,3
5	*Streptomyces sp. 15*	25± 0,2
6	*Streptomyces sp. 21*	45±0,1
7	*Streptomyces sp. 26*	16±0,8
8	*Streptomyces sp. 32*	16±1,2
9	*Streptomyces sp. 34*	14±0,3

Результаты показали, что все испытанные актиномицеты в той или иной мере подавляли рост гриба-патогена. Наибольшую активность проявили штаммы *Streptomyces sp.* 21 и *Nocardia sp.* 8, зона подавления роста гриба составляла 45 и 30 мм соответственно.

Низкую активность показали штаммы *Streptomyces sp.*34, *Streptomyces sp.*26 и

*Streptomyces sp.*32, при этом подавление роста *V. dahliae* составляло от 14 до16 мм.

Из изученных штаммов актиномицетов наиболее выраженно темно-окрашенные и устойчивые пигменты образовывали штаммы *Streptomyces sp.* 21, *Nocardia sp.* 8, *Amycolatopsis sp.* 51, *Nocardia sp.* 54, которые также проявили достаточно высокую антагонистическую активность к данному грибу (рис.2).

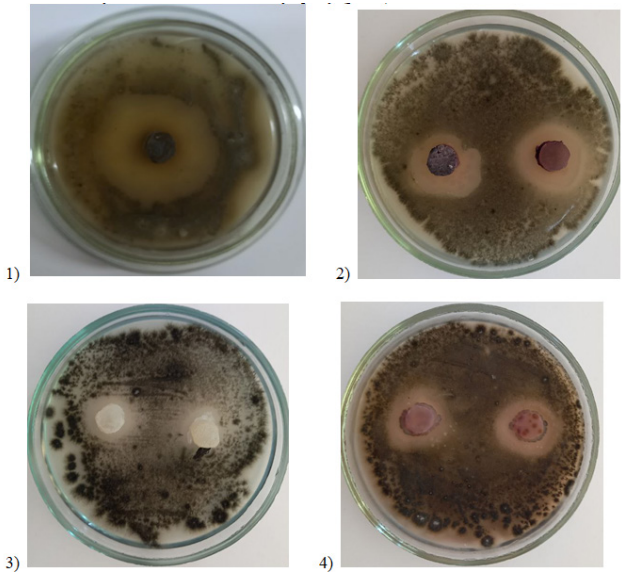


Рис. 2. Ингибирующее действие к патогену *Verticillium dahliae* пигментообразующих штаммов актиномицетов:
1) *Streptomyces sp.* 21, 2) *Nocardia sp.* 8, 3) *Amycolatopsis sp.* 51, 4) *Nocardia sp.* 54

Таким образом, установлено, что выделенные из почв различных антропогенных зон г. Ташкента местные штаммы пигментообразующих актиномицетов родов *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis* обладали достаточно высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогена *Verticillium dahliae*. И, так как, использование сапрофитных микроорганизмов в борьбе с грибами-паразитами основано на антагонистических отношениях, они могут быть рекомендованы к теоретическому и практическому применению для разработки новых биопрепаратов для борьбы с грибковыми болезнями растений.

Список литературы

1. Atta H.M., Bahobail A.S., El-Sehrawi M.H. Studies on isolation,

classification and phylogentic characterization of antifungal substance produced by *Streptomyces albidoflavus*-143, J. Science, 2011, 44, pp. 40-53.
2. Попова Е.Д. Подбор и оптимизация питательных сред для культивирования актиномицетов - продуцентов антибиотиков // Международный научно-исследовательский журнал. ISSN 2303-9868. №3 (34). 2015. Часть 2.
3. Baltz Richard H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes / Richard H. Baltz // Current Opinion in Pharmacology. -V. 8. -Is.5, October 2008. -P. 557 - 563.
4. Busti E., Monciardini P., Cavaletti L., Bamonte R., Lazzarini A., Sosio M., Donadio S. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes // Microbiology. -March 2006. -V. 152. -№ 3. -P. 675 - 683.
5. Dong-sheng Wang, Hai-ke Ren, Erihemu, Zhi-yi Zheng. Isolation, identification and antagonistic activity evaluation of actinomycetes in barks of nine trees // Arch Biol Sci. 2017. 69 (2). P. 345-351. https://doi.org/10.2298/ABS160429109W
6. Hiroyasu Onaka. Biosynthesis of indolocarbazole and goadsporin, two different heterocyclic antibiotics produced by actinomycetes // Bioscience, biotechnology and biochemistry. -V. 73. -2009. -№ 10. -P. 2149 - 2155.
7. Kawamura N., Kinoshita N., Sawa R., Takahashi Y., Sawa T., Naganawa H., Hamada M., Takeuchi T. Pyralomicins, novel antibiotics from *Microtetraspora* spiralis 1. Taxonomy and production // J. antibiot. - 1996. - V. 49 (7). - P. 706 - 709.
8. Hasnaa, Mouslim Assia, Moujabbir Sara, Amine Soukaina, Azougar Iman, Mouslim Jamal and Menggad Mohammed (2018). Isolation and phenotypic characterization of actinomycetes from Rabat neighborhood soil and their potential to produce bioactive compounds. J. African Journal of Microbiology Research. Vol. 12(8), pp. 186-191.
9. Stephan H., Kempter C., Metzger J.W., Jung G., Potterat O., Pfefferle C., Fiedler H.P. Kanchana micins, new polyol macrolide antibiotics produced by *Streptomyces* olivaceus Tu 4018. 2. Structure elucidation // J. Antibiot. - 1996. - V. 49(8). - P. 765 - 769.
10. Selvameenal L., Radhakrishnan M., Balagurunathan R. Antibiotic Pigment from Desert Soil Actinomycetes; Biological Activity, Purification and Chemical Screening// Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. pp.499-504.
11. Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics // Antonie van Leeuwenhoek// -2000. -V.78. -Is. 3 - 4. -P. 399 - 405.
12. Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? // Archives of Microbiology. - November 2001. -V. 176. -Is. 5. -P. 386 - 390.
13. Mamunur Rashid MD, Fakruddin MD, Reaz MM, Fatema K, Alimuddin chowdhury MD (2014). Anti-bacterial activity of pigments isolated from pigment-

forming soil bacteria. Br. J. Phar*m. R*es. 4:880-894.
14. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.Ф. Определитель актиномицетов -М.: «Наука», 1983. 244 с.
15. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. // М: Изд. МГУ, 2003. С.104.

ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ СЕМЕЙСТВА *CORDYCIPITACEAE* - ПОТЕНЦИАЛ В МЕДИЦИНЕ

Богомолова А.А.[1], Басалаева Д.Л.[2], Осмоловский А.А.[2]
[1]НИУ ВШЭ, Москва
[2]МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Изучение и поиск новых источников гидролитических ферментов имеют огромное значение в медицине. Гидролазы являются ключевыми компонентами для многих биологических процессов, таких как пищеварение, иммунный ответ и метаболизм. Они играют важную роль в разработке новых лекарственных препаратов и технологий. Например, липазы применяются для лечения ожирения [1], а танназы - лактазной недостаточности [2]. Поэтому поиск новых источников гидролаз является важным направлением научных исследований, которые могут привести к значительному прогрессу в медицине.

Цель данного исследования заключается в оценке гидролитического потенциала энтомопатогенов, принадлежащих к семейству *Cordycipitaceae*.

В работе использовали 11 штаммов энтомопатогенных грибов семейства *Cordycipitaceae*, выделенных на территории России с насекомых и ржавчины на листьях растений и принадлежащих к родам *Beauveria*, *Cordyceps*, *Akanthomyces*, *Simplicillium*. Штаммы культивировали на агаризованных средах с субстратами для гидролаз: Твин-80 для определения липазной активности, пектин - пектиназной, танин - танназной, крахмал - амилазной, целлюлоза - целлюлазной активности.

Штаммы сеяли одним уколом в центр чашки Петри и культивировали при 28 оС 4 дня. Зоны гидролиза визуализировали с помощью раствора Люголя для сред с крахмалом, пектином и целлюлозой, 1% желатина - с танином. Среда с Твин-80 содержала краситель метил-рот, соответственно зоны гидролиза проявлялись при изменении pH среды. Затем измеряли отношение диаметра зоны гидролиза субстрата к диаметру колонии организма. Полученные значения выражали как энзиматический индекс (EI).

Результаты работы демонстрируют, что самая высокая липазная активность присутствует у штаммов *Akanthomyces muscarius* 2 (EI=2.83) и *Cordyceps fumosorosea*

(EI=2.33). *Simplicillium wallacei* 1 - единственный активный продуцент пектиназ (EI=2.56). Танназной активностью, при этом высокой, обладает только штамм *Akanthomyces* cf. *aculeatus* (EI=2.91). Амилазная активность в среднем по всем исследованным штаммам была ниже, чем на других субстратах. Самое высокое значение - EI=1.91 - имеет *Simplicillium wallacei* 1. Около половины штаммов (45.5%) способны эффективно гидролизовать целлюлозу, при этом *Beauveria bassiana* (EI=2.94), *Simplicillium wallacei* 2 (EI=2.79) и *Akanthomyces muscarius* (EI=2.42) были самыми эффективными целлюлолитиками.

Таким образом, 81.8 % исследованных штаммов разлагали хотя бы один субстрат для гидролаз, при этом больше всего штаммов обладали пектиназной активностью (90.9%). Объяснением может служить потребность энтомопатогенных видов в большом количестве различных ферментов, позволяющих проникать через покровы и заражать хозяина [3]. Это делает энтомопатогенные грибы семейства *Cordycipitaceae* потенциальными активными продуцентами гидролаз, в частности липаз, пектиназ, танназ, амилаз и целлюлаз, которые широко применяются в медицине. Простота выделения и очистки грибных ферментов за счет того, что грибы секретируют их во внешнюю среду, делает данные организмы экономически привлекательными продуцентами в фармацевтической промышленности.

Список литературы

1. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P. K. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review // Microbial Cell Factories. 2020. Vol. 19, № 1.

2. Lekshmi R., Arif Nisha S., Thirumalai Vasan P., Kaleeswaran B. A comprehensive review on tannase: Microbes associated production of tannase exploiting tannin rich agro-industrial wastes with special reference to its potential environmental and industrial applications // Environmental Research. 2021. Vol. 201. P. 111625.

3. Mondal S., Baksi S., Koris A., Vatai G. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi // Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering. 2016. Vol. 18, № 2. P. 85–99.

СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИХ И ПЛАЗМОКОАГУЛИРУЮЩИХ ПРОТЕИНАЗ СРЕДИ МИКРОМИЦЕТОВ ОТДЕЛА MUCOROMYCOTA

Богуш М. А., Цао Ю.
МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Микроскопические грибы способны к образованию протеолитических ферментов различной природы, что обусловлено их сапротрофным типом питания. Протеиназы востребованы во многих сферах, в том числе и в медицине, как ферменты с фибринолитической и плазмокоагулирующей активностью. Некоторые представители родов

Rhizopus (1) и *Mucor* (2) уже описаны как продуценты подобных ферментов, некоторые грибы рода *Absidia* (*A. glauca*) проявляют плазминоподобную активность (3), поэтому перспективно продолжать исследования в этой области среди зигомицетов, расширяя представления об их способности к протеолизу различных белковых субстратов.

Было использовано 26 штаммов мукоромицетов из родов *Absidia*, *Actinomucor*, *Circinella*, *Cunninghamella*, *Gongronella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Mycotypha*, *Rhizomucor*, *Syncephalastrum*, *Thamnostylum*, *Umbelopsis* и *Zygorhynchus* – обитателей почв и растительных остатков Красноярского края, Волгоградской и Калужской областей, Архыза, Монголии и Вьетнама. Культивирование микромицетов для первичного скрининга проводили на жидкой среде, содержащей (в %): казеин – 1.0, пептон – 0.5, KH2PO4 – 0.05, MgSO4 – 0.025; в дальнейшем работали с культуральной жидкостью, содержащей экзоферменты микромицетов. Способность к фибринолитической и активаторной к плазминогену активности определяли методом фибриновых пластин. Для определения плазмокоагулирующей активности культуральную жидкость инкубировали с разведённой в 2 раза плазмой (4).

В результате проведенного первичного скрининга 23 штаммов было показано, что 6 из них – *Ab. spinosa*, *Ac. elegans*, *C. elegans*. *C. echinulata*, *S. racemosum* и *Z. moelleri* - обладали выраженной активаторной к плазминогену и фибринолитической активностью, 11 штаммов проявляли плазмокоагулирующую активность в различной степени, 4 штамма – *Ab. corymbifera*, *M. circinans*, *M. plumbeus* и *T. piriforme* продемонстрировали выраженную плазмокоагулирующую активность. Результаты первичного скрининга дали основания предполагать, что мукоровые грибы являются потенциальными продуцентами высокоэффективных ферментов тромболитического действия, которые возможно применять в препаратах данного спектра действия.

Вторичный скрининг проводили путём глубинного культивирования 20 штаммов из предыдущей выборки и 2 дополнительных штаммов мукоромицетов из коллекции кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова, отобранных ранее, на различных средах путём внесения смыва с культуры, выращенной на скошенном сусло-агаре, в качалочную колбу со 100 мл посевной следующего среды состава (%): сусло – 6.7, глюкоза – 2.0, пептон – 0.1, pH 5.5. После 2-х суток культивирования на орбитальной качалке (200 об/мин) при 28 °C 3% биомассы переносили в колбы с ферментационными средами № 1 и № 2 соответственно следующего состава (%): глицерин – 7.0, глюкоза – 3.0, гидролизат рыбной муки – 3.0, MgSO4 – 0.1; KH2PO4 – 0.1, pH 5.5; глюкоза – 3.5, крахмал – 0.125, гидролизат рыбной муки – 0.5, пептон – 0.5, NaCl – 0.2, MgSO4 – 0.05;

KH2PO4 – 0.05, pH 5.5. Полученные после 4-х суток культивирования на качалке культуральные жидкости фильтровали и использовали для дальнейших исследований. Из приведённой выборки 12 фильтратов культуральной жидкости штаммов подверглись анализу на проявление общей протеолитической активности, а также плазминоподобной и урокиназной активности. Остальные пробы анализировали дополнительно на наличие активаторных к протромбину и протеину С активностей, а также на количество белка в культуральной жидкости.

Анализ на наличие общей протеолитической активности проводили с помощью реакции с азоказеином (0.2% в 0.1 М растворе Tris-HCl, pH 8.2): к 200 мкл пробы добавляли 400 мкл раствора азоказеина и инкубировали 30 мин в термошейкере (37°С, 600 об/мин), после чего реакцию останавливали введением 600 мкл 10% раствора ТХУ и центрифугировали 7 минут при 13400 об/мин. Концентрацию продуктов азоказеинолиза определяли с помощью спектрофотометра при длине волны 340 нм.

Анализ протеолитической активности с хромогенными пептидными субстратами (ХПС) проводили с использованием субстратов S-2251, S-2444, S-2238 и S-2366 для определения плазминоподобной, урокиназной, активаторной к протромбину и активаторной к протеину С активностей соответственно. Для этого к 200 мкл пробы добавляли 50 мкл 0.05 М Tris-HCl буфера (в случае с S-2251 и S-2444) или плазмы (в случае с S-2238 и S-2366), разведённой в два раза, инкубировали 5 мин в термошейкере (37°С, 600 об/мин), после чего добавляли 100 мкл ХПС и инкубировали ещё 5 мин, затем останавливали реакцию добавлением 200 мкл 50% раствора уксусной кислоты. Активность рассчитывали путём измерения оптической плотности высвободившегося после реакции паранитроаналина при длине волны 405 нм (5).

Анализ на количество белка в растворе проводили по методу Брэдфорд: к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл раствора Кумасси (0,1 мг/мл), затем измеряли оптическую плотность полученных образцов при длине волны 595 нм и рассчитывали количество белка по калибровочному графику.

Полученные данные, представляющие особый интерес, представлены в виде диаграмм, отражающих наличие некоторых активностей у представителей мукоровых грибов (рис. 1, 2).

Полученные результаты вторичного скрининга позволили сделать вывод о наличии у *Absidia spinosa*, *Cunninghamella echinulata* и *Mucor plumbeus* активаторной к протромбину и протеину С активности, чего ранее обнаружено не было. Наиболее выраженную активность показала *Cunninghamella echinulata*, в настоящий момент ведётся работа по подтверждению этих данных и выделению ферментов.

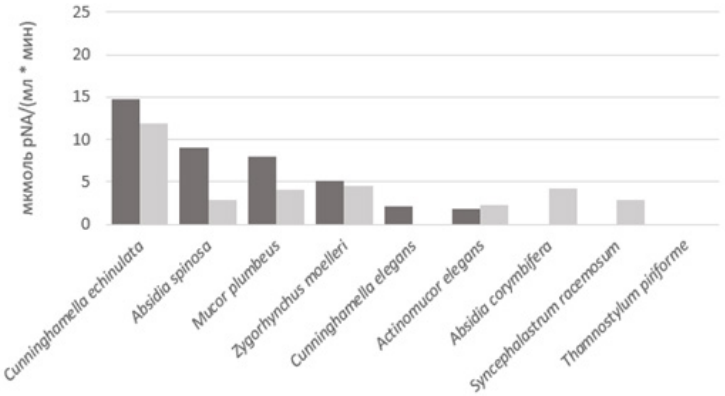


Рис. 1. Анализ на наличие активаторной к протромбину и протеину С активности с помощью реакции с субстратами S-2238 (тёмно-серый цвет) и S-2366 (светло-серый цвет); культивирование на ферментационной среде№ 1.

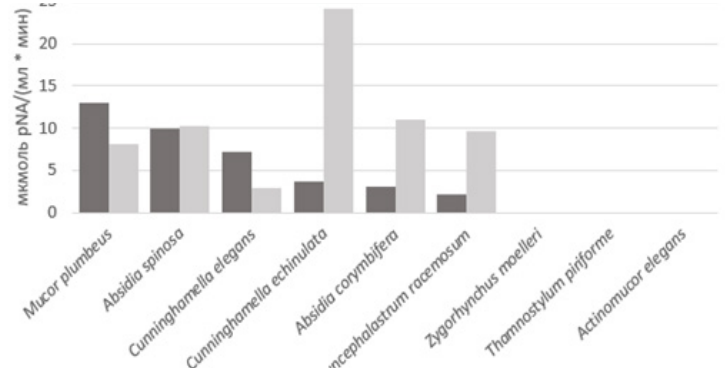


Рис. 2. Анализ на наличие активаторной к протромбину и протеину С активности с помощью реакции с субстратами S-2238 (тёмно-серый цвет) и S-2366 (светло-серый цвет); культивирование на ферментационной среде № 2.

Список литературы

1. Xiao-Lan L., Lian-Xiang D., Fu-Ping L., Xi-Qun Z., Jing X. (2005). Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus* chinensis 12. Appl. Microbiol. Biotechnol., 67, 2, 209 – 214.

2. Nascimento T. P., Sales A. E., Porto C. *S. e*t al. (2015). Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor* subtillissimus UCP

1262 in solid-state fermentation. Advances in enzyme research, 3, 81-91.

3. Шаркова Т. С., Кураков А. В., Осмоловский А. А. и др. (2015). Скрининг продуцентов протеиназ с фибринолитической и коллагенолитической активностями среди микромицетов. Микробиология, 84, 3, 316–322.

4. Егоров Н. С., Ушакова В. И. (1973). Образование непатогенными плесневыми грибами рода *Aspergillus* коагулаз, свёртывающих плазму и кровь человека. Доклады Академии наук СССР. Т. 211. № 1. С. 221 – 223.

5. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. (2012) Микромицеты *Aspergillus ochraceus* продуценты внеклеточных протеиназ активаторов протеина С плазмы крови Прикладная биохимия и микробиология. Т. 48. № 5. С. 537-537.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ДЕФЕНСИНЫ КАК ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ ПЕПТИДЫ С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ

Финкина Е.И.[1], Богданов И.В.[1], Фатеева С.И.[1,2], Шевченко О.В.[1,3], Воропаев А.Д.[4], Овчинникова Т.В.[1,2]

[1]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

[2]МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

[3]«МИРЭА — Российский технологический университет», Москва

[4]НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва

Candida albicans является представителем нормальной микрофлоры человека, но у пациентов с иммунодефицитными состояниями вызывает такие опасные для жизни системные инфекции, как кандидемия и инвазивный кандидоз. Ежегодно инвазивный кандидоз диагностируют у 250 тысяч пациентов, а смертность от него составляет около 40%. Кишечный эпителиальный барьер играет важную роль в защите от инвазии *C. albicans*, однако снижение иммунитета, чрезмерный воспалительный ответ, а также переход гриба в гифовую форму значительно повышают риск развития инвазивного кандидоза [1].

Известно, что инвазивные кандидозы плохо поддаются лечению, причиной чего в том числе является распространение резистентных к конвенциальным антимикотикам штаммов *C. albicans* [2]. Кроме того, показано, что большая эффективность лечения системных микозов достигается при комбинированной терапии противогрибковыми и иммуномодулирующими препаратами [3]. Поэтому поиск новых противогрибковых средств, обладающих также иммуномодулирующим действием, представляется весьма актуальной задачей. Прототипами

таких средств могут стать растительные дефенсины. Они характеризуются выраженной противогрибковой активностью, низкой токсичностью и высокой устойчивостью [4]. Последние данные указывают также на их способность модулировать иммунный ответ. Например, дефенсин из Capsicum chinense модулирует иммунный ответ эпителиальных клеток молочной железы крупного рогатого скота, инфицированных *Staphylococcus aureus*, индуцируя выработку как провоспалительных цитокинов TNF- и IL-1 , так и противовоспалительного IL-10 [5]. Сконструированный аналог растительных дефенсинов EgK5 влияет на Т-клеточный ответ при аутоиммунных заболеваниях [6]. Psd1 гороха в экспериментах in vivo не только ингибирует образование легочных метастазов у мышей, но и уменьшает количество воспалительных клеток в легочных тканях [7].

Целью данной работы являлось изучение противогрибковой активности и иммуномодулирующего действия растительных дефенсинов. Объектами исследования являлись дефенсин Nad1 из цветков табака *Nicotiana alata*, а также дефенсины из семян – Lc-def чечевицы *Lens culinaris*, Psd1 и Psd2 гороха *Pisum sativum*. Данные пептиды были получены биотехнологическим способом. Нуклеотидные фрагменты, кодирующие пептиды, получали методом синтеза de novo с использованием перекрывающихся праймеров и ПЦР. Полученные фрагменты встраивали в экспрессирующую плазмиду pET, кодирующую белок-носитель тиоредоксин А (TrxL) и октагистидиновую последовательность под контролем промотора Т7, методом безлигазного клонирования. Для получения штамма продуцента дефенсина компетентные клетки *Escherichia coli* штамма BL21 трансформировали полученными плазмидами pET-His8-TrxL-Nad1/Psd1/Psd2. Гетерологичную экспрессию пептидов проводили, выращивая трансформированные клетки при 30 на богатой питательной среде, содержащей 20 мМ глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина. Индукцию экспрессии осуществляли, добавляя аналог аллолактозы изопропил--D-1-тиогалактопиранозид. Выделение и очистку рекомбинантных дефенсинов проводили из растворимой фракции клеточного белка, используя металлохелатную хроматографию, диализ, расщепление гибридных белков бромцианом по искусственно введенному остатку метионина и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Высокое качество полученных препаратов рекомбинантных пептидов было подтверждено с помощью SDS-электрофореза в ПААГ, MALDI-TOF масс-спектрометрии и КД-спектроскопии.

Противогрибковую активность дефенсинов определяли методом двухкратных серийных разведений в 96-луночный планшетах в

отношении ряда чувствительных и резистентных штаммов *C. albicans*, выделенных на базе МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского из клинических изолятов пациентов с ВИЧ-инфекцией и орофарингеальным кандидозом. Резистентные штаммы *C. albicans* характеризовались выраженным снижением чувствительности к препаратам группы триазолов [8]. Рост *C. albicans* оценивали под микроскопом, а также по измерению оптической плотности культуры в лунках при помощи планшетного фотометра. Для оценки фунгицидного действия пептидов (МФК) содержимое лунок планшета после определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК100) высевали на чашки с Сабуро агаром и глюкозой. Проведенное исследование показало, что дефенсины бобовых растений Lc-def, Psd1и Psd2 оказывают фунгистатическое действие и ингибируют рост *C. albicans* с МИК50 25 мкМ. В тоже время Nad1 из цветков табака оказывает фунгицидное действие, одинаково активен против всех чувствительных и резистентных штаммов *C. albicans* с МИК100 12,5 мкМ и МФК также 12,5 мкМ. Микроскопический анализ показал, что все дефенсины не только ингибируют рост и размножение грибов, но и в высоких концентрациях вызывают лизис клеток.

Цитотоксическое действие полученных пептидов оценивали по их гемолитической активности, а также по способности влиять на жизнеспособность мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), используя тест с резазурином. Было показано, что растительные дефенсины не вызывают гемолиз эритроцитов. Lc-def, Psd1и Psd2 не оказывают цитотоксическое действие даже в концентрации 50 мкМ, тогда как Nad1 в высоких концентрациях, в несколько раз превышающих МИК100, снижает жизнеспособность PBMC.

Иммуномодулирующее действие дефенсинов Lc-def, Psd1 и Psd2 оценивали, используя мультиплексный анализ xMAP и различные типы иммунных клеток, таких как макрофаги, моноциты, дендритные клетки и Т-регуляторные клетки, а также клеточную линию Caco-2, имитирующую кишечный эпителий человека. Для этого клетки инкубировали в течение 24 часов с пептидами в низкой концентрации 2 мкМ. Было показано, что все дефенсины оказывают иммуномодулирующее действие, по-разному влияя на разные типы иммунных клеток и увеличивая продукцию как про-, так и противовоспалительных цитокинов/хемокинов. Наиболее выраженные эффекты наблюдались в случае Psd1 гороха.

Иммуномодулирующее действие Psd1 и Psd2 также исследовали в системе кокультивирования клеток Caco-2/*C. albicans*, имитирующих развитие кишечного кандидоза. Для этого к монослою поляризованных клеток Caco-2 добавляли суспензию *C. albicans* или пептид в низкой концентрации 2 мкМ, или и то, и другое вместе. Стимуляцию эпителия

проводили, инкубируя 24-луночные планшеты в CO2-инкубаторе в течение 4 и 24 ч. Микроскопический анализ показал, что в присутствии эпителия через 24 часа происходит переключение *C. albicans* с дрожжеподобной на гифовую форму. Из эпителиальных клеток выделяли суммарную РНК, проводили обратную транскрипцию с добавлением олиго-dT праймера и оценивали экспрессию генов провоспалительных цитокинов и защитных антимикробных пептидов с помощью метода ПЦР в реальном времени, используя интеркалирующий краситель SYBR Green. В качестве референсного гена использовали стабильно экспрессируемый в клетках Caco-2 ген GAPDH. Анализ экспрессии генов показал, что присутствие *C. albicans* через 4 часа индуцировало продукцию антимикробного пептида HBD-2 и провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-8 эпителиальными клетками, но при переходе гриба в гифовую форму через 24 часа происходило наоборот ингибирование экспрессии всех трех генов. Psd1 и Psd2 стимулировали экспрессию всех трех генов в клетках Caco-2. Более того, присутствие дефенсинов снижало ингибирующее действие патогенного гриба на продукцию защитных факторов иммунного ответа.

Таким образом, было показано, что исследуемые растительные дефенсины не только обладают противогрибковой активностью в отношении патогенных штаммов *C. albicans*, но и оказывают иммуномодулирующее действие на иммунные и эпителиальные клетки, влияя на продукцию защитных факторов иммунного ответа.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00654).

Список литературы

1. Sprague, J.L.; Kasper, L.; Hube, B. From Intestinal Colonization to Systemic Infections: *Candida albicans* Translocation and Dissemination. Gut Microbes. 2022, 14(1), e2154548–14.

2. Valand, N.; Girija, U.V. *Candida* Pathogenicity and Interplay with the Immune System. Adv Exp Med Biol. 2021, 1313, 241-272.

3. Fruitwala, S.; El-Naccache, D.W.; Chang, T.L. Multifaceted Immune Functions of Human Defensins and Underlying Mechanisms. Semin Cell Dev Biol. 2019, 88, 163-172.

4. Cools, T.L.; Struyfs, C.; Cammue, B.P.; Thevissen, K. Antifungal Plant Defensins: Increased Insight in Their Mode of Action as a Basis for Their Use to Combat Fungal Infections. Future Microbiol. 2017, 12, 441–454.

5. D az-Murillo, V.; Medina-Estrada, I.; L pez-Meza, J.E.; Ochoa-Zarzosa, A. Defensin -thionin from Capsicum chinense Has Immunomodulatory Effects on Bovine Mammary Epithelial Cells during *Staphylococcus aureus*

Internalization. Peptides. 2016, 78, 109–118.

6. Ong, S.T.; Bajaj, S.; Tanner, M.R.; Chang, S.C.; Krishnarjuna, B.; Ng, X.R. et al. Modulation of Lymphocyte Potassium Channel KV1.3 by Membrane-penetrating, Joint-targeting Immunomodulatory Plant Defensin. ACS Pharmacol. Transl. Sci. 2020, 3, 720–736.

7. Amaral, V.S.G.D.; Santos, S.A.C.S; de Andrade, P.C.; Nowatzki, J.; J nior, N.S.; de Medeiros, L.N. et al. *Pisum sativum* Defensin 1 Eradicates Mouse Metastatic Lung Nodules from B16F10 Melanoma Cells. Int J Mol Sci. 2020, 21(8), 2662.

8. Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Урбан Ю.Н., Зверев В.В., Несвижский Ю.В. и др. Экспрессия CDR1, CDR2, MDR1 и ERG11 у устойчивых к азолам штаммов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в городе Москве. Инфекция и иммунитет 2022, 12(5), 929-937.

АКТИВНОСТЬ МИКОЦИНОВ *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS* ПРОТИВ АСКОМИЦЕТНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Голубев В.И.
Всероссийская коллекция микроорганизмов, ИБФМ РАН, Пущино

Дрожжи *Wickerhamomyces anomalus* (Hansen) Kurtzman et al. привлекают в пристальное внимание своей антифунгальной активностью, благодаря чему их предложено использовать для типирования (Голубев, 2021), подавления патогенных и портящих пищевые продукты грибов. К настоящему времени очевидно высокое разнообразие антибиотических соединений, секретируемых этим видом. Так, согласно внутривидовой и внутриродовой антагонистической активности культуры его распадаются на три группы (Голубев, 2015).

В данной работе на чувствительность к внеклеточным соединениям (микоцинам), образуемым представителями этих групп, обследованы аскомицетные дрожжи (главным образом, их типовые штаммы и типовые виды) разных семейств, порядков и классов. Установлено, что к их микоцинам нечувствительны виды, принадлежащие классам *Schizosaccharomycetes* и *Taphrinomycetes* (подтип *Taphrinomycotina*), а также виды семейств *Dipodascaceae*, *Lipomycetaceae* и *Phaffomycetaceae* класса *Saccharomycetes* (подтип *Saccharomycotina*). Лишь единичные чувствительные виды (как правило, слабо) присутствуют в семействах *Debaryomycetaceae* и *Saccharomycopsidaceae*. Чувствительные виды найдены в восьми семействах *Saccharomycetes*, но относительные их количества в них весьма разнятся. В частности, примерно треть видов чувствительна

в семействах *Saccharomycetaceae* и *Saccharomycodaceae*, и около половины видов - в семействах *Metschnikowiaceae*, *Pichiaceae* и *Trichomonascaceae*. Чувствительны к микоцинам *W. anomalus* все обследованные типовые штаммы типовых видов родов *Barnettozyma*, *Cyberlindnera*, *Starmera* и *Wickerhamomyces* (*Wickerhamomycetaceae*).

Наиболее широки спектры действия микоцинов, синтезируемых представителями группы III. Судя по различиям в спектрах действия отдельных микоциногенных штаммов, выявленные группы *W. anomalus* в этом отношении очень гетерогенны, и возможность экстраполяции сведений, основанных на изучении единичных частично охарактеризованных микоцинов, на продуцируемые другими культурами данного вида, по-видимому, ограничена.

Список литературы

1. Голубев В.И., 2012. Микоцинотипирование. Микология и фитопатология 46, вып. 1, 3-13

2. Голубев В.И., 2015. Внутривидовая и внутриродовая антагонистическая активность *Wickerhamomyces anomalus*. Микробиология 84, N 2, 212-215

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНО-СПИРТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ШТАММОВ *GANODERMA LINGZHI* ИЗ ФОНДА ИНСТИТУТА ЛЕСА НАН БЕЛАРУСИ

Горбацевич Г.И.[1], Баталова И.Р.[1], Зеневич Л.С.[1], Коваленко С.А.[2], Оганесян Л.В.[1]

[1]Белорусский государственный университет, Минск

[2]Институт леса НАН Беларуси, Гомель

В настоящее время вторичные метаболиты трутовых грибов остаются относительно малоизученными. Одним из наиболее часто используемых в китайской и японской традиционной медицине грибов является *Ganoderma lingzhi*. Этот гриб также находит применение в составе пищевых добавок и косметических средств. Было показано, что препараты на его основе проявляют антиоксидантную, противоопухолевую, иммуномодулирующую, гипогликемическую, кардиопротекторную, противовоспалительную и антимикробную активность [1]. Ввиду того, что патогенез многих заболеваний связан с развитием оксидативного стресса, скрининг природных соединений на антиоксидантную активность представляется актуальным направлением исследования. Объектами изучения настоящей работы стали штаммы ксилотрофных

базидиомицетов из коллекции ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»: *G. lingzhi* S.H. Wu, Y. Cao & Y.C. Dai (штаммы 244, 266, 303, 304, 331, 333, 357, 362) и *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. (штаммы 171, 334, 335, 358) в качестве продуцентов новых высокоэффективных природных антиоксидантов [2].

Экстракты получали методом ремацерации, используя измельченные плодовые тела отдельных штаммов *G. lingzhi* и *G. lucidum* (1000 мкм) и 70% (об/об) этанол в качестве экстрагента. Экстракт фильтровали, упаривали в вакууме (40-50о С) на роторном испарителе и высушивали в вакуумном эксикаторе. Готовый продукт хранили в закрытой таре при температуре не выше 4 о С. Для определения суммарного содержания фенольных соединений использовали спектрофотометрический метод, основанный на восстановлении реактива Фолина-Чокальтеу [3]. Радикал-ингибирующую активность экстрактов изучали на модели DPPH-радикала и ABTS-катион-радикала по методике, описанной в [4].

Все исследованные экстракты характеризуются умеренной или высокой радикал-ингибирующей активностью в отношении DPPH. (IC50 = 3,7–77,1 мкг/мл) и ABTS.+ (IC50 = 3,1–149,9 мкг/мл). Содержание фенольных соединений в них варьируется от 12,8 до 555,1 мкг/г в пересчете на галловую кислоту. Отметим, что наиболее высокий антиоксидантный потенциал продемонстрировал культивированный на ольховом субстрате штамм *G. lucidum* P. Karst. 334 (IC50(DPPH) = 3,1 мкг/мл, IC50(ABTS) = 3,7 мкг/мл), превосходящий активность аскорбиновой (IC50(DPPH) = 4,9 мкг/мл, IC50(ABTS) = 1,5 мкг/мл), галловой кислоты (IC50(DPPH) = 4,6 мкг/мл, IC50(ABTS) = 0,7 мкг/мл), рутина (IC50(DPPH) = 63,1 мкг/мл, IC50(ABTS) = 3,9 мкг/мл) и водно-спиртового экстракта чаги (IC50(DPPH) = 77,6 мкг/мл, IC50(ABTS) = 34,5 мкг/мл). Таким образом, полученные в работе данные позволяют рассматривать указанный штамм *G. lucidum* в качестве перспективного источника природных антиоксидантов.

Список литературы

Ahmad, M.F. *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement / M.F. Ahmad // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2018. – Vol. 107. – P. 507-519.

Коваленко, С. А. Штаммовое разнообразие *Ganoderma lingzhi* и *G. lucidum* в коллекционном фонде Института леса НАН Беларуси / С. А. Коваленко, О. М. Назарова, В. М. Лубянова. Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов. – Вып. 82 / НАН Беларуси, Институт леса; редкол.: А. И. Ковалевич [и др.]. - Гомель, 2022- С .215-227

Singleton, V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and

antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Ravent s // Methods in Enzymology. – 1999. – Vol. 299. – P. 152-178

Kedare, S.B. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay / S.B. Kedare, R.P. Singh. // J. Food Sci. Technol. – 2011. – Vol. 48(4). – P. 412–442.

СКРИНИНГ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ОБРАЗЦОВ ИЗ ЧАГИ *INONOTUS OBLIQUUS* НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ЭКТРОМЕЛИИ

Кабанов А.С., Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Петровская И.Ф., Непомнящих Т.С., Пьянков О.В., Теплякова Т.В.
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово

Род Orthopoxvirus семейства Poxviridae включает в себя большую группу вирусов, в том числе патогенных для человека: вирус натуральной оспы (ВНО), вирус оспы обезьян (ВОО), вирус оспы коров (ВОК), вирус эктромелии (ВЭ) и др. В результате отказа от вакцинации против натуральной оспы после ее ликвидации в 1980 году в человеческой популяции ежегодно увеличивается количество людей, утративших специфический иммунитет против данного заболевания. Вместе с тем угроза возникновения оспы существует, поскольку невозможно исключить наличие нелегального хранения ВНО и преднамеренного использования против людей природных или рекомбинантных ее штаммов, а также распространения ВНО из мерзлотных грунтов с останками умерших от нее. С другой стороны, близкие по структуре к ВНО зоонозные ортопоксвирусы также представляют опасность для человека.

ВЭ — это специфичный для мыши ортопоксвирус, вызывающий летальную инфекцию. Инфекция ВЭ у мышей была тщательно изучена, и ее патогенез с локализованной репликацией и системным распространением аналогичен патогенезу ВНО у людей [1]. ВЭ является лучшей моделью для изучения оспы на мелких лабораторных животных как для изучения основных вопросов патогенеза, оценки профилактических и терапевтических методов лечения оспы, так и для разработки контрмер против ортопоксвирусов, созданных с помощью биоинженерии для повышения вирулентности, трансмиссивности или способности преодолевать вакцинный иммунитет [2].

Цель работы - скрининг противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* на культуре клеток Vero в отношении ВЭ с определением их противовирусной эффективности при использовании двух схем внесения препаратов и ВЭ: профилактической и лечебной. Образцы, проверенные в отношении ВЭ in vitro, будут рассматриваться как перспективные для разработки препаратов от ортопоксвирусов и в дальнейшем будут исследованы в отношении ВЭ in vivo.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали ВЭ, штамм К-1, полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирус нарабатывали в культуре клеток Vero. Концентрация вируса, использованного в работе, составляла 6,4 lg БОЕ/мл. В предварительных экспериментах на культуре клеток Vero была подобрана минимальная доза ВЭ, вызывающая 100% ЦПД в лунке, 1000 БОЕ/лунку.

Клеточные культуры. В работе использовали клетки почки взрослой африканской зеленой мартышки (Vero E6), полученные из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Подготовка образцов. Для исследования были использованы водные экстракты природной чаги, меланин из чаги [3, 4]. Масса сухого вещества каждого из экстрактов составляла 2 мг/мл.

Оценка изменения инфекционности ВЭ in vitro под влиянием исследуемых образцов. Противовирусная эффективность исследуемых образцов оценивалась по изменению инфекционности ВЭ (титра) в монослое клеток Vero E6.

Профилактическая схема. На монослой культуры клеток вносили по 0,1 мл образца и помещали в термостат на 2 часа при температуре +370С, затем вносили по 0,1 мл вируса.

Лечебная схема. Заражение клеточного монослоя осуществляли ВЭ в объеме 0,1 мл. Планшет с внесенным вируссодержащим материалом помещали в термостат на 1 час при +37°С для адсорбции вируса на культуру клеток, затем в лунки вносили разведения образца в объеме 0,1 мл.

Конечная концентрация образцов в лунке была 300, 100, 33,33, 11,11 и 3,70 мкг/мл.

Каждая схема применения образцов in vitro была

воспроизведена в 4 повторах.

Метод определения цитотоксичности и противовирусной активности препаратов. Оценку противовирусной эффективности образцов проводили по адаптированной и модифицированной нами методике [5]. В лунки 96-луночных планшетов, содержащих монослой клеток Vero, сначала вносили в соответствии со схемами серийные разведения исследуемых образцов и ВЭ в дозе 1000 БОЕ/лунку. Токсическая активность соединений определялась по гибели клеток под воздействием образца в лунках планшета, в которые вирус не вносили. В качестве контролей использовали монослои клеток в лунках планшета, в которые вносили вирус без образца (контроль вируса) и монослои клеток в лунках, в которые не вносили ни вирус, ни образцы (контроль культуры клеток). После инкубирования в течение 6 суток, монослой клеток прокрашивали витальным красителем нейтральным красным в течение 2 часов, после удаления красителя добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированное живыми клетками монослоя, оценивали по оптической плотности (ОП), которая является показателем количества неразрушенных под влиянием вируса клеток в монослое. ОП измеряли на спектрофотометре Emax (Molecular Devices, США) при длине волны 490 нм. Учет результатов проводили с использованием планшетного спектрофотометра Emax и программы SoftMax 4.0 (Molecular Devices, США), которая автоматически рассчитывала 50%-ю токсическую концентрацию (TC50 в мкг/мл) и 50%-ю ингибирующую (эффективную) концентрацию (IC50 в мкг/мл) образцов. По соотношению 50%-й токсической и эффективной концентраций определяли терапевтический индекс (TI) (или индекс селективности – SI): TI = TC50 / IC50. Активными считаются соединения с $SI \geq 8$ [6].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [7]. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Противовирусная активность образцов из чаги в отношении вируса эктромелии штамма К-1 в 2-х схемах применения.

Код образца	Масса сухого вещества, мг/мл	Вещество, примечание	Схема применения	TC_{50}, мкг/мл	IC_{50}, мкг/мл	SI (TC_{50}/IC_{50})
1	2	3	4	5	6	7
20-13	2,0	экстракт чаги	Профилактическая/	>300	2.84	105,6
			Лечебная	300	2,25	133,3
20-15	2,0	экстракт чаги	Профилактическая/	>300	2.08	**144,2**
			Лечебная	300	**1,97**	**152,3**
20-17	2,0	экстракт чаги	Профилактическая	>300	2.91	103
			Лечебная	>300	2,89	103,8
20-24	2,0	меланин	Профилактическая	>300	2.33	128,7
			Лечебная	>300	3,38	88,7
20-29	2,0	меланин	Профилактическая	>300	3.41	88
			Лечебная	>300	3,58	83,8
20-30	2,0	меланин	Профилактическая	>300	3.17	94,6
			Лечебная	>300	3,02	99,3

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы 1 исследуемые образцы не являются токсичными для монослоя культуры клеток Vero E6 в разведении от 300 и более мкг/мл. Все образцы показали высокую противовирусную активность в отношении ВЭ штамма К-1 в двух схемах применения – профилактической и лечебной.

У 3 исследованных образцов 20-13, 20-15 и 20-17 SI в двух схемах применения был выше 100. Водный экстракт чаги 20-15 проявил выраженное противовирусное действие. В лечебной схеме применения, при концентрации всего 1,97 мкг/мл, он вызывал 50% ингибирующее действие. Следует отметить, что SI у этого образца был самым высоким и составил в профилактической схеме применения 144,2, а в лечебной – 152,3. Образец меланина из чаги 20-24 также показал противовирусное действие с высоким SI при профилактической схеме применения. Остальные два образца 20-29 и 20-30 показали противовирусную активность. Данные эксперименты проводились в 4 повторениях с интервалом в 1 неделю. Все результаты были сопоставимы.

Таким образом, все образцы, проверенные в отношении ВЭ in vitro, могут рассматриваться как перспективные для разработки препаратов от ортопоксвирусов. Ранее нами были проведены исследования по оценке водных экстрактов грибов и некоторых гуминовых соединений в отношении ВНО и вируса осповакцины [8]. Было отмечено, что чага содержит широкий спектр биологически активных веществ, основным компонентом которых является хромоген-полифенолоксикарбоновый комплекс, близкий по физико-химическим характеристикам к гуминовым кислотам. Водные экстракты чаги, меланин проявляли противовирусный эффект ко всем исследуемым нами вирусам, в том числе ко многим штаммам вируса гриппа и к коронавирусу SARS-CoV-2, вызвавшему эпидемию COVID-19 [9].

Безусловно необходимо дальнейшее изучение гриба чаги и некоторых ее компонентов с целью разработки на их основе лекарственных и профилактических препаратов против заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Список литературы

1. Jordan R, Hruby D. Smallpox antiviral drug development: satisfying the animal efficacy rule. Expert Rev Anti Infect Ther. 2006; 4: 277–289.

2. Buller R.M. Mousepox: a small animal model for biodefense research. Appl Biosaf. 2004; 9: 10–19.

3. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О. и соавт. Ингибитор репликации коронавируса SARS- CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus* obliguus. Патент РФ № 2741714, 28.01.2021 г. Бюл. № 4.

4. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О. и соавт. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе меланина из гриба *Inonotus obliquus*. Патент РФ № 2747018, опубл. 23.04.2021 г. Бюл. № 12.

5. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. Antiviral Research. 2003; Vol. 57(1-2): 13-23.

6. Хабриев Р.У., редактор. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2005. 832 с.

7. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. 598 с.

8. Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А. и соавт. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов. Проблемы особо опасных инфекций. 2012; 3(113): 99-101.

9. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Safatov A.*S. et* al. Water Extract of the Chaga Medicinal Mushroom, *Inonotus obliquus* (*Agaricomycetes*), Inhibits SARS-CoV-2 Replication in Vero E6 and Vero Cell Culture Experiments. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2022; 24 (2): 23-30.

ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СУХИХ ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЛИШАЙНИКОВ И ЧАГИ НА РЕПЛИКАЦИЮ SARS-CoV-2 IN VITRO

Казачинская Е.И., Зайковская А.В., Иванова А.В., Пьянков О.В.
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово

Лишайники - сложные совокупности симбиоза микроорганизмов - микобионта (грибкового партнера) и фотобионта (фотоавтотрофного партнера в виде водорослей или цианобактерий), представляют собой в значительной степени неиспользованный ценный источник биоактивных вторичных метаболитов. Как правило, лишайники процветают в надземных нишах с ограниченным количеством воды, часто выдерживая экстремальную жару, высыхание или холод. По данным обширного обзора литературы, биоактивные соединения, выделенные из лишайников, имеют фотозащитную природу и обладают противовоспалительными, антиоксидантными и антимикробными свойствами [1]. Известно и противовирусное действие препаратов из лишайников. Например, описана активность in vitro сухого водного экстракта цетрарии (*Cetraria islandica L.*) против вируса гриппа субтипов A/H3N2 и A/H5N1 [2], порошка слоевищ кладонии (*Cladonia*) против вируса гриппа и вируса простого герпеса 1 типа [3]. Кершенгольц с соавт. показали, что применение «Бетукладина» (препарата из слоевищ лишайников рода *Cladonia* и бетулина из коры березы), повысило эффективность комплексного лечения больных хроническим гепатитом С. При профилактике новой коронавирусной инфекции (COVID-19) заболеваемость среди принимавших «Бетукладин» составила 3 %, а в группе сравнения - 13,1 % [4]. В Индии Joshi с соавт. подвергли виртуальному скринингу (in silico) 412 соединений лишайников и пришли к выводу, что калицин (Calycin) и ризокарпиновая кислота (Rhizocarpic acid) обладают значительными структурными и фармакологическими свойствами связывания с основной протеазой (Mpro/3CLpro) SARS-CoV-2 [5]. Gupta с соавт. (научная группа также из Индии) in silico выбрали из библиотеки 26 соединений лишайников три вещества - это усниновая (usnic), вариоларовая (variolaric) и гирофорная (gyrophoric)

кислоты, которые обладают потенциалом ингибирования Mpro/3CLpro SARS-Cov-2 и могут стать кандидатами на противовирусные препараты против новой коронавирусной инфекции [6]. Ученые из Италии in silico анализировали природу связывания вторичных метаболитов лишайника - протоцетраровой (protocetraric) и салазиновой (salazinic) кислот, в отношении Mpro/3CLpro SARS-CoV-2 и in vitro показали низкую цитотоксичность этих соединений, а также ингибирующую активность на рекомбинантную протеазу [7]. Результаты анализа с цельными экстрактами *Cetraria islandica*, полученными при использовании разных экстрагентов (гексана, метилтретбутилового эфира и 70 %-й этанола) демонстрируют, что препараты проявили ингибирование протеазы Mpro/3CLpro SARS-Cov-2. При этом водный экстракт *Cetraria islandica* ингибирования не проявил [8]. Таким образом, многими авторами показана эффективность препаратов, приготовленных из лишайников в отношении широкого спектра вирусных агентов, однако в научной литературе пока нет экспериментальных данных по ингибирующей активности препаратов лишайников в отношении коронавируса SARS-CoV-2.

Целью настоящего исследования стал анализ ингибирующей активности сухих этанольных экстрактов лишайников видов уснея (*Usnea*, *Parmeliaceae*), псевдоверния зернистая (*Pseudevernia furfuracea*, *Parmeliaceae*), кладония звездчатая (*Cladonia stellaris*, *Cladonia*ceae), цетрарии исландской (*Cetraria islandica*, *Parmeliaceae*) и чаги (*Inonotus obliquus* Ach. ex Pers. Pil., *Basidiomycota*), растворенных в ДМСО, на репликацию SARS-CoV-2 in vitro при прямой инактивации, «профилактической» и «лечебной» схемах.

Материалы и методы

Растительное сырье. Лишайники: уснея (*Usnea*, *Parmeliaceae*) и псевдеверния зернистая (*Pseudevernia furfuracea*, *Parmeliaceae*) (рис. 1 a, c), собраны авторами вручную непосредственно с хвойных деревьев 24.07.2021 в Горном Алтае на Семинском перевале (51°2'43"N 85°36'13"E, 1900 м над уровнем моря). Кладония звездчатая (*Cladonia stellaris*, *Cladonia*ceae) (рис. 1 b) собрана 9.05.2022 г. с мест произрастания (с земли) в Караканском бору в Новосибирской области (54°15 52 с. ш. 81°58 34 в. д.). Свежие лишайники очищали от примесей и сушили при температуре 18-25°C в проветриваемом помещении, защищенном от солнечных лучей. После сушки полученное растительное сырье сохраняли в тех же условиях. Идентификация видов лишайников была любезно проведена ведущим научным сотрудником лаборатории низших растений Центрального Сибирского Ботанического Сада СО РАН, д.б.н., профессором Сидельниковой Н.В. с использованием

стандартных методов. Сырье цетрарии исландской (*Cetraria islandica*, *Parmeliaceae*) (рис. 1 d) сбора 2021 г. в Горном Алтае, в измельченном виде любезно предоставлено ООО НПФ «Золотая долина», г. Новосибирск.

Рис. 1. Виды лишайников, использованных в исследовании.

Примечание: a. Уснея (*Usnea*, *Parmeliaceae*); b. Кладония звездчатая (*Cladonia stellaris*, *Cladonia*ceae); c. Псевдеверния зернистая (*Pseudevernia furfuracea*, *Parmeliaceae*); d. Цетрария исландская (*Cetraria islandica*, *Parmeliaceae*), произрастающая на поверхности земли в урочище Манас (выше села Эдиган, Чемальский район Республики Алтай) (51°3'43"N 86°28'28" E).

Фото лишайников Казачинская Е.И.

Получение спиртовых экстрактов, анализ цитотоксичности проводили как описано [9]: сухое измельченное сырье в соотношении 1/10 по весу (4 г/40 г) заливали очищенным 70% этиловым спиртом и выдерживали семь суток на механической качалке (100 об./мин) при комнатной температуре. Жидкие фракции фильтровали через капроновую ткань и высушивали в асептических условиях при 30±20С в открытых ч. Петри. Сухой осадок этанольных экстрактов хранили при комнатной температуре.

В качестве контрольных образцов использовали экстракты

растительного сырья, ингибирующая эффективность которых была показана ранее – это чага (*Inonotus obliquus*) [10; 11; 12; 9] и черный чай (*Camellia sinensis L.*) [13; 14; 9]. Сырье чаги (собранной в Новосибирской области) и черного чая из Индии предоставлено ООО НПФ «Золотая долина», г. Новосибирск.

Вирус. В работе использовали коронавирус SARS-CoV-2, из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ БВ «Вектор» Роспотребнадзора штамм hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (генетический вариант B). Инфицирующая доза вируса в тканевых цитопатических дозах 2 3 lg ТЦД50/0,1мл на лунку. Анализ ингибирующей активности сухих этанольных экстрактов лишайников и контрольных образцов, растворенных в ДМСО, проводили на культуре клеток Vero E6 с использованием трех схем исследования. Схема «прямой нейтрализации» вируса: готовили последовательные двукратные разведения исследуемых препаратов, смешивали их с рабочим разведением вируса в равных объемах, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего суспензии экстрактов с вирусом наносили на монослой культуры клеток, как описано для исследования нейтрализующей активности антител, переболевших COVID-19 [15]. При «профилактической» схеме разведения экстрактов наносили на монослой культуры клеток за 2 часа до инфицирования, при «лечебной» схеме инфицирование культуры клеток проводили за 2 часа до нанесения разведений исследуемых препаратов, как описано [16].

Контроли были поставлены: контроль клеток – в лунки культурального планшета вносили поддерживающую питательную среду с добавлением 2% термоинактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота и антибиотиков (Antibiotic-Antimycotic «Gibco», Thermo Fisher Scientific, USA); контроль растворителя - в лунки культурального планшета вносили разведения ДМСО в концентрациях, аналогичных таковым для исследуемых образцов. Все исследования были проведены в двух независимых экспериментах. Статистическую обработку результатов проводили с применением метода Спирмена-Кербера в программе Excel при 95%-ном уровне надежности ($p \leq 0.05$).

Результаты и обсуждение

Сухие этанольные экстракты являются более концентрированной формой, полученной из растительного сырья, по сравнению с водными вытяжками или отварами. Этиловый спирт (как правило, водно - спиртовая смесь в разном соотношении) используется в фармацевтической практике как наиболее подходящий экстрагент для

извлечения из сырья БАВ, в том числе флавоноидов и терпеноидов [17]. Диметилсульфоксид (ДМСО) является универсальным растворителем, особенно для молекул, плохо растворимых в воде [18].

Из 4 г сухого растительного сырья нами были приготовлены сухие этанольные экстракты лишайников в диапазоне концентраций 0,47 - 0,55 г (табл. 1) Для использования в экспериментах растворение сухих экстрактов проводили в ДМСО из расчета 200 мг/мл на механической качалке при комнатной температуре и 100 об./мин. в течение суток.

Таблица 1. Сведения о получении сухих этанольных экстрактов лишайников и контрольных образцов.

№ п/п	Название растительного сырья		Количество растительного сырья, использованного для получения препарата (г)	Выход сухого этанольного экстракта (г)	Кратность концентрирования (раз)
	Русское	латинское			
1	*Уснея*	*Usnea*	4	0,55	7,3
2	*Псевдеверния зернистая*	*Pseudevernia furfuracea*	4	0,47	8,5
3	*Кладония звездчатая*	*Cladonia stellaris,*	4	0,51	7,8
4	*Цетрария исландская*	*Cetraria islandica,*	4	0,53	7,5
5	чага	*Inonotus obliquus*	4	0,91	4,4
6	черный чай	*Camellia sinensis*	4	0,63	6,3

Метод прямой инактивации (нейтрализации) используется для поиска веществ, деструктивно действующих на структурный S-белок SARS-CoV-2, тем самым предотвращающих «вход» вируса в инфицируемую клетку. Например, в 2020 г. Kanjanasirirat с соавт. продемонстрировали, что этанольный экстракт корневища имбиря *Boesenbergia rotunda* (*Zingiberaceae*) подавляет инфекционность SARS-CoV-2 (штамм SARS-CoV-2/01/human/Jan2020/Thailand) в титре 25 ТЦД50/мл этапе «входа» вируса в клетку с 50%-ной ингибирующей концентрацией (IC50) равной 20,42 мкг/мл (при 50%-й цитотоксичности CC50≥100 мкг/мл) [19]. Mohamed с соавт. продемонстрировали, что метанольный экстракт травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum L.*) активен в диапазоне IC50 =1,5 – 15,0 мкг/мл при прямой инактивации вариантов SARS-CoV-2 Альфа, Бета, Дельта и Омикрон [21].

В наших экспериментах по схеме прямой инактивации (нейтрализации) препараты лишайников и контрольных образцов можно расположить в следующем порядке (по убывающей активности, измеряемой в 50%-х эффективных концентрациях, EC50): черный чай (1,1±0,3 мкг/мл), псевдеверния зернистая (2,9±0,9 мкг/мл), цетрария исландская (4,6±1,3 мкг/мл), чага (7,2±1,3 мкг/мл), уснея (9,1±2,6 мкг/мл) и кладония звездчатая (18,2±5,1 мкг/мл) (табл. 2).

Схемы эксперимента «профилактическая» и «лечебная» применяются для поиска веществ, действующих в качестве ингибиторов на основную протеазу Mpro/3CLpro, папаин-подобную протеазу (PLpro) или на РНК-зависимую-РНК-полимеразу (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase) SARS-CoV-2 [16; 22; 23]. Mohamed с соавт. показали, что метанольный экстракт травы зверобоя продырявленного активен против вариантов SARS-CoV-2 Альфа, Бета, Дельта и Омикрон в примерно одинаковом диапазоне ингибирующих концентраций (1,5 – 15,0 мкг/мл) как при прямой инактивации, а также и по схемам «профилактическая» и «лечебная» [21]. Значение IC50=3,62 мкг/мл (при добавлении этанольного экстракта корневища имбиря к инфицированным клеткам) Kanjanasirirat с соавт. считают мощной противовирусной активностью [20].

Результаты проведенных нами экспериментов показали, что для исследованных образцов сухих этанольных экстрактов показатели EC50 при прямой инактивации значительно превышают таковые при «лечебной» и «профилактической» схемах.

Исследованные препараты лишайников и контрольных образцов можно расположить в следующем порядке (по убывающей активности, измеряемой в 50%-х эффективных концентрациях, EC50)) по «профилактической» схеме: чага (6,5±1,61 мкг/мл), черный чай и цетрария исландская (9,1±2,6 мкг/мл), псевдеверния зернистая (28,65±5,10 мкг/мл), кладония звездчатая (52,1±12,9 мкг/мл) и уснея (114,6±20,4 мкг/мл); по схеме «лечения» клеток: цетрария исландская (15,3±6,2 мкг/мл), чага (16,9±6,2 мкг/мл), черный чай (28,6±5,1 мкг/мл), кладония звездчатая (57,3±10,2 мкг/мл), псевдеверния зернистая (104,2±25,8 мкг/мл) и уснея (208,3±51,6 мкг/мл) (табл. 3).

Таблица 2. Эффективность инактивации штамма hCoV-19/Australia/VIC01/2020 коронавируса SARS-CoV-2 сухими этанольными экстрактами

лишайников и контрольных образцов.

		EC50	
Уснея	833,33±206,60	9,1±2,6	9
Псевдевернния зернистая	916,7±163,33	2,9±0,9	31
Кладония звездчатая	1166,7±326,7	18,2±5,1	6
Цетрария исландская	833,3±206,6	4,6±1,3	18
Чага	187,5±122,5	7,2±1,3	2
Черный чай	791,67±265,88	1,1±0,3	71

Таблица 3. Ингибирующая активность сухих этанольных экстрактов лишайников и контрольных образцов в отношении штамма hCoV-19/ Australia/VIC01/2020 коронавируса SARS-CoV-2 при профилактической и лечебной схемах.

№ п/п	Название растительного сырья	**CC50**	Схемы эксперимента			
			профилактическая		лечебная	
			EC50	**IS**	**EC50**	**IS**
1	*Уснея*	750,0±219,1	114,6±20,4	6,5	208,3±51,6	3,6
2	*Псевдевернния зернистая*	583,33±163,33	28,65±5,10	20,4	104,2±25,8	5,6
3	*Кладония звездчатая*	291,67±81,66	52,1±12,9	5,6	57,3±10,2	5,1
4	*Цетрария исландская*	395,83±132,94	9,1±2,6	43,5	15,3±6,2	25,9
5	Чага	104,17±25,82	6,5±1,61	16,0	16,9±6,2	6,2
6	Черный чай	416,7±103,3	9,1±2,6	45,8	28,6±5,1	14,6

Исследуемые образцы сухих этанольных экстрактов лишайников в эксперименте in vitro показали низкую токсичность для культуры клеток Vero E6 в диапазоне 833,3±206,6 -1166,7±326,7 мкг/мл (при контакте с монослоем клеток в течение 1 часа при 37оС) и в диапазоне 291,67±81,66 - 750,0±219,1 мкг/мл (при более длительном контакте). На основании полученных данных по 50%-й цитотоксичности (CC50) и 50%-ным эффективным концентрациям (EC50) исследуемых препаратов были рассчитаны индексы селективности (SI) (табл. 2, табл. 3). Низкие показатели токсичности экстрактов лишайников позволили получить высокие значения индексов селективности исследуемых образцов - от 64,1 до 316,1 при прямой инактивации, от 5,6 до 43,5 при профилактической схеме, от 3,6 до 25,9 при схеме «лечения» клеток, что свидетельствует об их высокой ингибирующей активности in vitro.

По данным литературы, индексы селективности in vitro для препаратов, полученных из природного сырья, варьируют в широком

диапазоне и зависят от цитотоксичности анализируемых образцов. Например, Kanjanasirirat с соавт. определили для этанольного экстракта корневища имбиря и его индивидуального флавоноида пандуратина А показатели SI=4,9 и 8,20, соответственно [20]. Теплякова с соавт. в патенте РФ по ингибирующему действию лиофильно высушенных и концентрированных водных экстрактов *Inonotus obliquus* на штамм nCoV/Victoria/1/2020 SARS-CoV-2 представили значение SI в диапазоне 16,73 - 155,5 для разных образцов [12]. Для сухого этанольного экстракта корня шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*), растворенного в ДМСО, (при значениях CC50=500 мкг/мл, и EC50=0,74 мкг/мл) SI=675,67 [24]. Nie с соавт. определили для сухих этанольных экстрактов полыней видов *Artemisia annua* и *A. afra*, собранных на разных континентах, SI в диапазоне от 3,54 до 275,00 [25]. В работе по исследованию сухих этанольных экстрактов отдельных частей растения (стеблей, цветов, листьев) нескольких видов полыней (*Artemisia spp.*), произрастающих в Новосибирской области, мы недавно показали, что, например, показатели SI по схеме прямой инактивации (нейтрализации) SARS-CoV-2 находились в диапазоне от 3,99 до 795,45, при профилактической схеме в диапазоне от 3,2 до 64,0 и при схеме «лечения» клеток в диапазоне от 3,71 до 59,73 [9].

Таким образом, сухие этанольные экстракты лишайников, а также приготовленные нами контрольные образцы (сухие этанольные экстракты черного чая и чаги), оказались активны в отношении коронавируса SARS-CoV-2 при всех использованных схемах эксперимента (табл. 2, табл. 3). На основании полученных нами результатов, можно предположить наличие в сырье лишайников видов *Usnea*, *Pseudevernia furfuracea*, *Cladonia stellaris* и *Cetraria islandica*, а также чаги и черного чая, биологически активных веществ, растворимых в этанольном спирте и действующих на разные циклы «жизненного цикла» SARS-CoV-2, при этом обладающих низкой цитотоксичностью. Для дальнейших исследований необходим анализ профиля и количественного содержания отдельных активных компонентов этих экстрактов методами хроматографии, тестирование протективного, лечебного и/или профилактического эффекта цельных экстрактов и/или отдельных веществ в отношении коронавируса SARS-CoV-2 на чувствительных животных.

Список литературы

1. Manojlovic N. T., Vasiljevic P. J., Maskovic P. Z., Juskovic M. & Bogdanovic-Dusanovic G. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen Umbilicaria cylindrica (L.) Delise (Umbilicariaceae). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

2012. Doi:10.1155/2012/452431

2. Мазуркова Н.А., Седельникова Н.В., Макаревич Е.В., Филиппова Е.И., Костина Н.Е., Кукушкина Т.А. Противовирусное средство на основе сухого экстракта лишайника *Cetraria islandica*. Патент RU №2580305; опубл. 10.04.2016 Бюл. №10.

3. Шашурин М.М., Кершенгольц Б.М. Композиция на основе бетулина и слоевищ лишайников, обладающая антибактериальным, противовирусным и детоксикационным действием. Патент RU 2710236 C1. 25.12.2019. eLIBRARY ID: 41664831

4. Кершенгольц Б.М., Шашурин М.М., Слепцова С.С., Винокурова М.К., Колосова О.Н. Биопрепарат из природного северного сырья и возможности его использования при профилактике, лечении и на этапе ремиссии после перенесенных бактериальных и вирусных инфекций, включая COVID-19. Природные ресурсы Арктики и Субартики. 2021. Том 26, № 3. С. 12-135. Doi: 10.31242/2618-9712-2021-26-3-120-135

5. Joshi T., Sharma P., Joshi T., Pundir H., Mathpal S., Chandra S. Structure-based screening of novel lichen compounds against SARS Coronavirus main protease (Mpro) as potentials inhibitors of COVID-19. Mol Divers. 2021;25(3):1665-1677. Doi: 10.1007/s11030-020-10118-x

6. Gupta A., Sahu N., Singh A.P., Singh V.K., Singh S.C., Upadhye V.J. et al. Exploration of Novel Lichen Compounds as Inhibitors of SARS-CoV-2 Mpro: Ligand-Based Design, Molecular Dynamics, and ADMET Analyses. Appl Biochem Biotechnol . 2022;194(12):6386-6406. Doi: 10.1007/s12010-022-04103-3

7. Fagnani L., Nazzicone L., Bellio P., Franceschini N., Tondi D., Verri *A. e*t al. Protocetraric and Salazinic Acids as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 3CL Protease: Biochemical, Cytotoxic, and Computational Characterization of Depsidones as Slow-Binding Inactivators. Pharmaceuticals (Basel). 2022;15(6):714. Doi: 10.3390/ph15060714

8. Ощепкова А.Д. Извлечение экстрактивных веществ из лишайников *Cetraria islandica* и изучение противовирусных свойств полученных экстрактов. Труды молодых ученых Алтайского государственного университета. 2022; 19:262-264. eLIBRARY ID: 49944281.

9. Казачинская Е.И., Романова В.Д., Иванова А.В., Чепурнов А.А., Муртазалиева З.А., Кононова Ю.В. и др. Ингибирующая активность сухих этанольных экстрактов *Artemisia spp.* на репликацию SARS CoV 2 in vitro. Юг России: экология, развитие. 2022;17(4):111 129. Doi.org/10.18470/1992-1098-2022-4-111-129

10. Tian J., Hu X., Liu D., Wu H., Qu L. Identification of *Inonotus obliquus* polysaccharide with broad-spectrum antiviral activity against multi-feline viruses. Int J Biol Macromol. 2017;95:160-167. Doi: 10.1016/j.

ijbiomac.2016.11.054

11. Eid J.I., Das B., Al-Tuwaijri M.M., Basal W.T. Targeting SARS-CoV-2 with Chaga mushroom: An in silico study toward developing a natural antiviral compound. Food Sci Nutr. 2021;9(12):6513-6523. Doi: 10.1002/fsn3.2576

12. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Потешкина А.Л., Овчинникова А.С. и др. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus obliquus*. Пат. РФ № 2741714C1; опубл. 28.01.2021 в Бюл. №4.

13. Ishimoto K., Hatanaka N., Otani S., Maeda S., Xu B., Yasugi M., Moore J.E., Suzuki M., Nakagawa S., Yamasaki S. Tea crude extracts effectively inactivate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. Lett Appl Microbiol. 2022;74(1):2-7. Doi: 10.1111/lam.13591.

14. Kicker E., Tittel G., Schaller T., Pferschy-Wenzig E.-M., Zatloukal K., Bauer R. SARS-CoV-2 neutralizing activity of polyphenols in a special green tea extract preparation. Phytomedicine. 2022;98:153970. Doi: 10.1016/j.phymed.2022.153970

15. Kazachinskaia E., Chepurnov A., Shcherbakov D., Kononova Y., Saroyan T., Gulyaeva M. et al. IgG Study of Blood Sera of Patients with COVID-19. Pathogens. 2021;10(11):1421. Doi: 10.3390/pathogens10111421

16. Tolah A.M., Altayeb L.M., Alandijany T.A., Dwivedi V.D., El-Kafrawy S.A., Azhar E.I. Computational and In Vitro Experimental Investigations Reveal Anti-Viral Activity of Licorice and Glycyrrhizin against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. Pharmaceuticals (Basel). 2021;14(12):1216. Doi: 10.3390/ph14121216

17. Евсеева С.Б., Сысуев Б.Б. Экстракты растительного сырья как компоненты косметических и наружных лекарственных средств: ассортимент продукции, особенности получения (обзор). Фармация и фармакология. 2016;3:4-37. Doi.org/10.19163/2307-9266-2016-4-3-4-37

18. Galvao J., Davis B., Tilley M., Normando E., Duchen M.R., Cordeiro M.F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. FASEB J. 2014;28(3):1317-30. Doi: 10.1096/fj.13-235440

19. Gironi B., Oliva R., Petraccone L., Paolantoni M., Morresi A., Vecchio P.D., Sassi P. Solvation properties of raft-like model membranes. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2019; 1861(11):183052. Doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183052

20. Kanjanasirirat P., Suksatu A., Manopwisedjaroen S., Munyoo B., Tuchinda P, Jearawuttanakul K., Seemakhan S., Charoensutthivarakul S., Wongtrakoongate P., Rangkasenee N. et al. High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component Panduratin A as anti-SARS-CoV-2 agents. Sci Rep. 2020;10(1):19963. Doi: 10.1038/s41598-020-77003-3

21. Mohamed F.F., Anhlan D., Sch fb nker M., Schreiber A., Classen N., Hensel A., Hempel G., Scholz W., K hn J., Hrincius E.R., Ludwig S. *Hypericum perforatum* and Its Ingredients Hypericin and Pseudohypericin Demonstrate an Antiviral Activity against SARS-CoV-2. Pharmaceuticals (Basel). 2022; 15(5):530. Doi: 10.3390/ph1505053

22. Swargiary A., Mahmud S., Saleh M.A. Screening of phytochemicals as potent inhibitor of 3-chymotrypsin and papain-like proteases of SARS-CoV-2: An in silico approach to combat COVID-19. J. Biomol. Struct. Dyn. 2022;40:2067–2081. Doi: 10.1080/07391102.2020.1835729

23. da Rocha Matos A., Caetano B.C., de Almeida Filho J.L., de Carvalho Martins J.S.C., de Oliveira M.G.P., das Chagas Sousa T., Horta M.A.P., Siqueira M.M., Fernandez J.H. Identification of Hypericin as a *Candida*te Repurposed Therapeutic Agent for COVID-19 and Its Potential Anti-SARS-CoV-2 Activity. Front Microbiol. 2022; 13:828984. Doi: 10.3389/fmicb.2022.828984

24. Liu H., Ye F., Sun Q., Liang H., Li C., Li S., Lu R., Huang B., Tan W., Lai L. *Scutellaria baicalensis* extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease in vitro CoV-2. J Enzyme Inhib Med Chem. 2021. 36(1):497-503. Doi:10.1080/14756366.2021.1873977

25. Nie C., Trimpert J., Moon S., Haag R., Gilmore K., Kaufer B.B., Seeberger P.H. In vitro efficacy of *Artemisia* extracts against SARS-CoV-2. Virol J. 2021.; (1):182. Doi: 10.1186/s12985-021-01651-8

ЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ ПРЯНЫХ РАСТЕНИЙ УЗБЕКИСТАНА – ИСТОЧНИКИ АНТИКОАГУЛЯТНЫХ ВЕЩЕСТВ

Кузиева Н.Х., Абдульмянова Л.И., Гулямова Т.Г.
Институт микробиологии АН РУз, Узбекистан, Ташкент

Антикоагулянтные вещества предотвращают сердечно-сосудистые заболевания, вызванные тромбами, воздействуя на белки, ответственные за свертывание или факторы свертывания крови. Антикоагулянты необходимы для краткосрочного лечения артериального и венозного тромбоза и для долгосрочной профилактики рецидива [6]. На протяжении десятилетий гепарин животного происхождения является основным средством антикоагулянтной терапии острых тромботических заболеваний. Однако, он имеет ограничения клинического применения, связанные с неэффективностью у пациентов с дефицитом антитромбина, геморрагическими осложнениями, развитием гепарин-ассоциированной тромбоцитопенией, иммуносупрессией и остеопорозом при длительном применении [4].

Антикоагулянты растительного происхождения с древних времен широко используются в народной медицине. Но несмотря на то, что, лекарственные растения исторически являются первыми источниками антикоагулянтных веществ, выделение из них стабильных соединений затруднено из-за истощения видов, длительности выращивания, сезонного роста и других причин. Таким образом, поиск новых веществ с антикоагулянтным действием является весьма актуальным.

Одним из таких альтернативных источников антикоагулянтных веществ являются эндофитные грибы – микроорганизмы, бессимптомно обитающие в теле растений. В последнее десятилетие большой интерес вызывает способность эндофитных грибов синтезировать крупномасштабные вторичные метаболиты [1]. Вещества, выделяемые эндофитами, относятся к разным структурным группам: терпеноиды, стероиды, ксантоны, хитоны, фенолы, изокумарины, бензопирононы, тетралоны, цитохалазины, энниатины [2]. Эти вторичные метаболиты, проявляют противомикробные, антиканцерогенные, противогрибковые, антибактериальные и антикоагулянтные свойства.

В связи с вышеперечисленным в лаборатории биохимии и биотехнологии физиологически активных соединений Института микробиологии АН РУз при изучении эндофитной микробиоты пряных растений были выделены эндофитные грибы и изучен их антикоагулянтный потенциал.

Объект исследования и используемые методы

С целью выделения изолятов эндофитных грибов были собраны образцы пряных растений с холмов Кибрайского района Ташкентской области. Растения идентифицировали по их морфологическим признакам: базилик, тимьян, сельдерей, петрушка, лук, чеснок, кориандр, укроп, тмин, мята, мелисса, шалфей, душица, чабрец.

Выделение эндофитных грибов проводили, как описал Strobel et al., но с небольшими изменениями. Для выделения эндофитов образцы корней, стеблей, листьев растений предварительно замачивали в 70% этиловом спирте на 1 мин, затем промывали стерильной водой, образцы асептически измельчали до толщины 0,5 см. и высевали на питательную среду Чапека-Докса с агаром в чашку Петри. В среду в чашках добавляли 50 мг/мл хлортетрациклина и 250 мг/мл стрептомицина для остановки роста бактерий. Чашки выращивали при 28°С в течение 7-14 дней. Выращенные изоляты грибов культивировали на чистой агаризованной среде Чапека-Докса, не содержащей антибиотиков.

Для накопления биомассы изоляты эндофитных грибов выращивали на картофельно-декстрозном бульоне на качалке при температуре 28оС в течение 10-14 дней. Выросший мицелий сепарировали от культуральной

жидкости при 6000 об/мин. и хранили при -20 оС [8].

Для выделения метаболитов из биомассы эндофитных грибов использовали метод Hazalin et al. с небольшой модификацией [3]. Замороженную биомассу измельчали в фарфоровой ступке со стеклянным песком. Полученный гомогенат помещали в колбу с 50 мл этилового эфира уксусной кислоты, выдерживали на ультразвуковой качалке 10 минут и оставляли на 24 часа при комнатной температуре. Затем массу фильтровали через фильтровальную бумагу (Wattman #1) и добавляли 40 мкг/мл сульфата натрия для удаления водного слоя. Полученный экстракт упаривали на роторном испарителе с последующим растворением в 0,9% растворе NaCl. Готовый экстракт хранили при +4°С.

Коагуляционные тесты - протромбиновое время (РТ), активированное частичное тромбопластиновое время (АРТТ), тромбиновое время (ТТ), фибриногенный тест проводили на аппарате Huma Clot Junior (Human GmbH, Висбаден, Германия). Инкубацию плазмы с добавлением экстрактов проводили при 37°С. Для этого у обследуемого брали 3 мл крови и помещали в пробирку с 3,8% раствором цитрата натрия. Пробирку вращали в центрифуге при 3000 об/мин в течение 3 минут и отделяли плазму.

Для определения протромбинового времени (РТ) образцы 50 мкл плазмы и 10 мкл экстракта смешивали в отдельной кювете. Отбирали 50 мкл этой смеси и инкубировали в чистой кювете в течение 15 секунд, затем добавляли 100 мкл реагента (Human GmbH, Висбаден, Германия) и исследовали.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АРТТ) смешивали с образцами 50 мкл плазмы и 10 мкл экстракта в отдельной кювете. Взяв 50 мкл этой смеси, к ней в чистую кювету добавляли 50 мкл реагента 1 и инкубировали 15 секунд, затем добавляли 50 мкл реагента 2 (CaCl2) и исследовали.

Для определения тромбинового времени (ТТ) образцы 100 мкл плазмы и 20 мкл экстракта смешивали в отдельной кювете. Отбирали 75 мкл этой смеси и инкубировали в чистой кювете в течение 15 секунд, затем добавляли 75 мкл реагента и исследовали.

Для тестирования фибриногена (Fib) образцы 5 мкл плазмы и 1 мкл экстракта смешивали в отдельной кювете. Отбирали 5 мкл этой смеси и разводили в 95 мкл буферного раствора в чистой кювете и инкубировали 15 секунд, затем добавляли 50 мкл реагента и исследовали. [5,7].

Полученные результаты и их обсуждение

Эндофитные грибы проявившие антикоагулянтные свойства, были выделены из стеблей и листьев сельдерея (*Apium graveolens*) и кориандра

(*Coriandrum sativum*). Результаты коагуляционных тестов 4 изолятов AG3S и AG11L из *Apium graveolens*, CS6S и CS21L из *Coriandrum sativum* представлены в таблице 1.

1:5;15 секунд инкубация	PT			APTT		TT	Fib	
	Вр.сек	PTI(%)	INR	Вр.сек	Rati		Вр.сек	г/л
Норма	11.6	104.0	0.97	31.9	1.14	16.3	22.3	1.69
Гепарин	>81	-	-	>241	-	>301	>81	>4.0
0.9% NaCl фракция								
AG3S	10.1	130.4	0.84	20.3	0.73	10.8	31.6	0.90
AG11L	13.1	85.4	1.11	40.5	1.45	18.5	38.5	<0.70
CS6S	16.9	56.2	1.47	101.3	3.62	28.6	44.0	<0.70
CS21L	21.9	39.1	1.96	72.1	2.58	18.6	33.9	0.76

Как видно из данных таблицы, тест протромбинового времени (PT) состоял из 3 показателей: протромбиновое время в секундах, протромбиновый индекс (PTI) в процентах и международное нормализованное отношение (INR). Поскольку все образцы не агрегировали плазму крови, протромбиновое время составило 10,1-21,9 секунды, протромбиновый индекс - 39,1-130,4%, международное нормализованное отношение - 0,84-1,96. Среди них изолят CS21L имел относительно низкий протромбиновый индекс - 21,9 секунды после добавления в плазму внешних факторов свертывания крови.

При изучении эффективности внутреннего и общего путей свертывания крови, а именно активированного частичного тромбопластинового времени (APTT), результаты колебались от 20,3 до 101,3 секунд. При этом экстракт изолята CS6S более чем в 3 раза увеличивал время образования тромбов по сравнению с контролем.

При тестировании тромбинового времени (TT) изолят CS6S показал почти двукратное увеличение по сравнению с нормальным значением в крови. Это показало, что время, необходимое для превращения фибриногена в фибрин, увеличилось. При проверке количества белка фибриногена, превращающегося в нерастворимые нити фибрина, показатели ниже 0,70 г/л свидетельствовали о длительном времени

образования тромба.

В результате данных исследований был отобран изолят CS21L, выделенный из *Coriandrum sativum*, имеющий относительно низкое значение протромбинового индекса после добавления в плазму внешних факторов свертывания крови, высокое активированное частичное тромбопластиновое время и почти в два раза более высокие значения тромбинового времени по сравнению с нормальными показателями крови.

Таким образом, эндофитные грибы пряных растений, в частности кориандра, являются весьма перспективными источниками антикоагулянтных соединений.

Список литературы

1. Arnold AE, Mejia LC, Kyllo D, Rojas EI, Maynard Z, et al. (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. (2003) Proc Natl Acad Sci100: 15649–15654

2. Bacon C.W., Mhite J.F. Microbial Endophytes. Marcel Dekker, New-York, p. 85-117.

3. Hazalin N.A., Ramasamy K., Lim S.M., Wahab I.A., Cole A.Lj, Majeed A.A. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. BMC Complementary and alternative medicine. 2009, 9:46. 49

4. Lapikova ES, Drozd NN, Tolstenkov AS, Makarov VA, Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Bakunina IU, Besednova NN, Kuznetsova TA: Inhibition of thrombin and factor Xa by Fucus evanescens fucoidan and its modified analogs. Bull Exp Biol Med 2008, 146:328–333.

5. Mahdi Alikhani Pour, Soroush Sardari, Ali Eslamifar, Abid Azhar, Mohammad Rezvani and Milad Nazari "Cheminformatics-Based Anticoagulant Study of Traditionally Used Medicinal Plants",2017, Iranian Biomedical Journal 21(6): 400-405

6. Moll S, Roberts HR: Overview of anticoagulant drugs for the future. Semin Hematol 2002, 39:145–157.

7. Muhammad Akram, Abid Rashid "Anti-coagulant activity of plants: mini review" (2017) J Thromb Thrombolysis 44:406–411

8. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu R.S., and Hess W. M., "Taxol from *Pestalotiopsis* microspora, an endophytic fungus of Taxus wallachiana," Microbiology (Reading), vol. 142 (Pt 2), pp. 435–440, Feb. 1996, doi: 10.1099/13500872-142-2-435.

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *ASPERGILLUS* КАК ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕАЗ С ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

***Лавренова В.Н.*[1], *Шестакова А.А.*[1,2], *Суркова Д.Е.*[1,2], *Осмоловский А.А.*[1,2]**

[1]*МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва*

[2]*НИУ ВШЭ, Москва*

Систему механизмов поддержания целостности сосудистого русла и предотвращения кровопотерь называют гемостазом. Многие нарушения в работе системы гемостаза приводят к тромбообразованию внутри сосуда в отсутствии факторов, повреждающих целостность стенки сосуда. Такие явления, в свою очередь, способствуют развитию у пациентов тромбозов разной степени тяжести, что сильно снижает качество и продолжительность жизни. Разнообразие механизмов, обеспечивающих формирование тромбов, а также сложная система взаимодействий между этими механизмами затрудняет поиск универсальных противосвёртывающих препаратов. Более того, многие существующие в настоящее время противотромбозные средства эффективны только при определённых видах тромбозов и имеют побочные эффекты. В связи с этим, поиск новых, возможно более универсальных и более безопасных противосвёртывающих веществ является актуальной задачей.

Микроорганизмы известны своей способностью продуцировать ферменты, обладающие тромболитической активностью. Так, стрептокиназа, производимая бактериями рода *Streptococcus*, а также наттокиназа, производимая бактериями рода *Bacillus* [1], широко используются в клинической практике для лечения тромбозов. Микромицеты обладают большим по сравнению с бактериями разнообразием секретируемых протеаз, поэтому целью данной работы был скрининг тромболитического потенциала ферментов 15 ранее не исследованных видов рода *Aspergillus*.

Глубинное культивирование микромицетов производили в течение 48 часов на посевной среде (в %: сусло – 6,7, глюкоза – 1,0, пептон – 0,1, pH 5,5-6,0) при 28 С и постоянном перемешивании со скоростью 200 оборотов/мин. Далее для индукции образования протеолитических ферментов 3% объёма посевной среды переносили в соответствующий объём ферментационной среды 1 (в %: глицерин – 7,0, глюкоза – 3,0, гидролизат рыбной муки – 3,0, сульфат магния – 0,1, дигидрофосфат

калия – 0,1) или ферментационной среды 2 (в %: глюкоза – 3,5, крахмал – 1,0, гидролизат рыбной муки – 0,5, пептон – 0,5, хлорид натрия – 0,2, дигидрофосфат калия – 0,05, сульфат магния – 0,05). Культивирование производили в течение 96 часов при 28 С и постоянном перемешивании со скоростью 200 оборотов/мин, после чего осуществляли оценку фибринолитического потенциала культуральной жидкости методом фибриновых пластин [2]. Специфическую протеолитическую активность культуральной жидкости по отношению к компонентам системы гемостаза определяли спектрофотометрически при помощи хромогенных пептидных субстратов компании Chromogenics [2]. В работе использовали субстраты тромбина (Chromozym), плазмина (S-2251), фактора Ха (S-2765), урокиназы (S-2444) и протеина С (S-2366).

По результатам экспериментов фибринолитическая активность была обнаружена у 8 из 15 исследуемых видов. Специфическая протеолитическая активность культуральной жидкости выбранных 8 микромицетов была измерена при помощи хромогенных пептидных субстратов. *A. europaeus* и *A. tubingensis*, несмотря на положительный результат в тесте с использованием фибриновых пластин, не показали выраженной протеолитической активности по отношению к использованным хромогенным субстратам. Культуральная жидкость *A. aureolatus* показала довольно высокие активности по отношению ко всем использованным субстратам, причём активность по отношению к субстрату плазмина и субстрату урокиназы была значительно выше, чем у уже изученных продуцентов фибринолитических протеаз [3,4]. Однако, высокая активность культуральной жидкости *A. aureolatus* по отношению ко всем изученным субстратам, так же, как и высокая активность культуральной жидкости *A. tenneseensis*, может свидетельствовать о низкой субстратной специфичности секретируемых протеаз. Такие протеазы могут найти применение в биотехнологии и биодеградации, но вряд ли смогут быть использованы в качестве лекарственных препаратов. Оставшиеся 4 вида микромицетов секретируют довольно специфичные протеазы: ферменты *A. creber* и *A. protuberus* активны в отношении субстрата протеина С, фермент *A. melleus* – в отношении субстратов тромбина и плазмина, фермент *A. tabacinus* – в отношении субстратов тромбина и протеина С. Эти протеазы представляют интерес для дальнейшей разработки фибринолитических препаратов.

Список литературы

1. Yanagisawa Y., Chatake T., Naito *S. e*t al. X-ray structure determination and deuteration of nattokinase. J Synchrotron Radiat. 2013; 20, 875-879.

2. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.*A. e*t al. Production of extracellular proteinases - Protein C activators of blood plasma - by the micromycete *Aspergillus ochraceus* during submerged and solid-state fermentation. Appl Biochem Microbiol. 2013; 49, 581–586.

3. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G. et al. The effects of micromycete extracellular proteases of the *Aspergillus* genus on the proteins of the haemostatic syste*m. R*uss J Bioorganic Chem. 2014. 40, 634–639.

4. Lukianova A.A., Kornienko E.I., Vigand P.*A. e*t al. Secretion by micromycetes of proteases with activity similar to the activity of the hemostatic system proteins. Moscow Univ Biol Sci Bull. 2020. 75, 31–35.

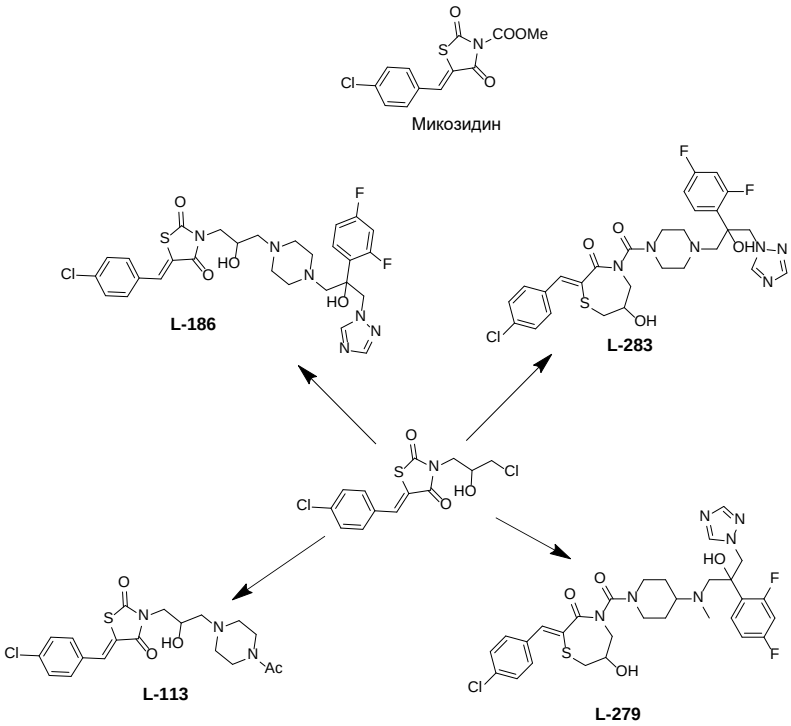
НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАЗОЛИДИН-2,4-ДИОНА И ИХ ГИБРИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ СРЕДСТВА

Левшин И.Б., Грамматикова Н.Э., Симонов А.Ю., Панов А.А., Польшаков В.И.

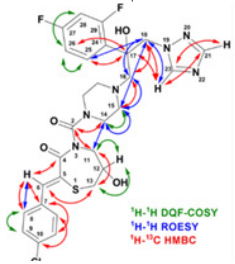
НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе, Москва

В последние десятилетия во всем мире растёт угроза распространения грибковой инфекции. Причин для столь неутешительного прогноза несколько: это и постоянно растущая резистентность коммерческим противогрибковым препаратам, в особенности к группе триазольных препаратов: флуконазол, итраконазол, вориконазол, и изменение видового состава выявляемых патогенов в пользу *non-albicans Candida* (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*), и появление новых штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (*C. auris*). ВОЗ недавно представила доклад с перечислением наиболее проблемных патогенов и охарактеризовала решение проблемы грибковой инфекции как приоритетную задачу, стоящую перед здравоохранением [1]. В связи с этим получение новых молекул и исследование их свойств как потенциальных лекарственных средств представляет собой важнейшую задачу, требующую незамедлительного решения.

Продолжая поиск новых противогрибковых средств в ряду тиазолидин-2,4-дионов, первый представитель которых – отечественный препарат наружного действия Микозидин® – обладал выраженной активностью в отношении грибов дерматофитов, нами были получены различные 3-замещенные производные широкого спектра действия, действующие не только на дерматофиты *Microsporum spp.* и *Trichophiton spp.*, но и системно на филаментозные и на дрожжевые грибы вида *C. albicans* и C. *non-albicans*.



Для получения 3-замещенных производных (2-гидроксипропил)-тиазолидин-2,4-диона с остатком ацетилпиперазина (L-113) использовали реакцию соответствующего 3-(2-гидрокси-3-хлорпропил)-5-(4-хлорбензилиден) тиазолидин-2,4-диона с ацетилпиперазином в толуоле в присутствии триэтиламина. В этих же условиях был получен гибрид пятичленного тиазолидин-2,4-диона с триазолом (L-186). Использование ДМФА вместо толуола как растворителя привела к получению семичленного производного - 6-гидрокси-1,4-тиазепан-3-она (L-283), строение которого доказано с помощью двумерной ЯМР спектроскопии с применением 1H-1H DQF-COSY, 1H-1H-ROESY, 1H-13C-HMBC, показывающие взаимодействия атомов через 2-3 связи.



При использовании другого циклического амина было получено (метиламино)пиперидин-1-карбонил)-6-гидрокси производное 1,4-тиазепан-3-она (L-279).

Микробиологический скрининг полученных производных тиазолидина и тиазепан-3-она проведен с использованием стандартных штаммов и клинических изолятов. Критерием

правильности проведенного эксперимента служит использование стандартных антигрибковых препаратов, активность которых нормирована по отношению к стандартным штаммам по ГОСТ Р ИСО 16256-2015.

Для контроля проводимых исследований и сравнительной активности синтезированных соединений использовали субстанции коммерческих препаратов: итраконазол (Itraconazole, Sigma-Aldrich), кетоконазол, флуконазол, а также нистатин. Результаты исследования приведены в таблицах 1 и 2.

Анализ осуществляли методом микроразведений в соответствии с Методическими рекомендациями [2]. Все изучаемые образцы соединений растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO), концентрация основных растворов составляла 10000 мкг/мл. Для получения рабочих растворов основные растворы разводили в питательной среде RPMI до концентрации 64 мкг/мл. Диапазон изучаемых концентраций составлял значения от 32,0 до 0,015 мкг/мл.

Тест-штаммы	МИК (мкг/мл)										
	L-113		**L-186**		**L-283**		**L-279**		**Итрако-назол**	**Флуконазол**	
	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	24ч	48ч
C. parapsilosis 58Л	8	16	0,06	0,25	0,125	0,5	0,5	1	0,25	8	16
C. parapsilosis АТСС 22019*	0,5	1-2	0,06-0,125	0,25	0,25	0,25	0,125	0,5	0,125	4	4
C. utilis 84	1	1-2	1	2	1	2	1	32	0,125	2	2
C. tropicalis 3019	0,125	1	1	1	2	8	4	4	2	16	16
C. glabrata 61Л	4-8	16-32	2	4	2	16	2	16	0,5	8	8-16
C. albicans 604 M (R)	4-8	16-32	8	8	>32	>32	32	>32	16-32	>32	>32
C. albicans 8 R	32	>32	0,5	16	>32	>32	>32	>32	16	>32	>32
C. krusei 432M	0,25-0,5	0,25-0,5	2	2	8	16	8	16	0,5-1	32	>32
Cryptococcus neoformans	32	32	0,25	0,25	>32	>32	32	>32	0,125	4	4

Таблица 1. МПК исследуемых образцов в сравнении с препаратами итраконазол и флуконазол.

Как видно из таблицы 1, базовое производное тиазолидин-2,4-диона (L-113) несколько уступало по активности гибридным производным, но превосходило по активности флуконазол, в особенности в отношении природно-резистентных к нему *C. krusei*, а также *C. tropicalis* 3019 со сниженной чувствительностью. *C. krusei* 432M более чувствителен к соединению L-113, чем к итраконазолу, однако разница в значении МПК не превышает 1-2 разведений.

Для гибридного производного L-186 включение в состав молекулы фармакофорного триазольного фрагмента приводило к снижению значений МПК практически для всех штаммов, кроме *C. krusei* 432M (МПК 2 мкг/мл против 0,5-1,0 мкг/мл для итраконазола). Это

производное по активности превосходит итраконазол в отношении штаммов, нечувствительных к флуконазолу: на *C. albicans* 8R и *C. albicans* 604 M значение МПК в несколько раз ниже, чем для препаратов сравнения. Таким образом, замена тиазолидин-2,4-дионового цикла на тиазепановый цикл с оксипиперазинильным линкером (L-279, L-283) значительно повышает активность.

Соединения содержащие семичленный цикл с оксипиперазинильным (L-283) и оксиметиламино-пиперидиновым (L-279) линкерами схожи по активности в отношении чувствительных к флуконазолу штаммов, но приводит к потере активности в отношении штаммов, устойчивых к флуконазолу и *Cryptococcus neoformans*.

В то же время, L-279 (таблица 2) более эффективен в отношении дерматофитов: *M. canis* и *T. rubrum*. Производное L-113, не проявляет значимую активности в отношении *Aspergillus spp.* и демонстрирует умеренную чувствительность дерматофитов. Наилучшие показатели по значениям МПК, сопоставимые с кетоконазолом, были получены при исследовании L-186, в отношении *Aspergillus spp.* и дерматофитов.

	МПК(мкг/мл)			
	A. niger **137a**	*A. fumigatus* **ATCC 46645**	*M. canis* **B-200**	*T. rubrum* **2002**
L-113	>32	16-32	8	2-4
L-186	**2-4**	**2-4**	**0,25**	**0,125**
L-283	8	8	>32	>32
L-279	8-16	16	0,06	1
Нистатин	16	8	1-2	8
Флуконазол	8	>32	8	4
Кетоконазол	4	0,5	0,5	0,25

Таблица 2. МПК исследуемых образцов в сравнении с препаратами кетоконазол, флуконазол и нистатин.

В целом изученные производные проявляют селективную антифунгальную активность, а гибридное производное тиазолидин-2,4-диона с триазолом (L-186) значительно эффективнее подавляет рост резистентных к флуконазолу и итраконазолу штаммов, что несомненно является основанием для продолжения поиска высокоактивных молекул в этих рядах соединений.

Список литературы

1. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and

public health action. https://www.who.int/ru/news/item/25-10-2022-who-releases-first-ever-list-of-health-threatening-fungi
2. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2021-01 https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf

БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЕ ЭКСТРАКТЫ БАЗИДИОМИЦЕТОВ С АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Лысакова В. С.[1,2], Рогожин Е. А.[2], Синева О. Н.[1], Краснопольская Л. М.[1]
[1]НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе, Москва
[2]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Грибы способны производить различные по химическому составу и по биологической активности вещества. Это могут быть как высоко-, так и низкомолекулярные соединения. Особенный интерес представляют высшие грибы по причине их гораздо меньшей изученности и широкого спектра функциональной активности. Различные виды грибов продуцируют вторичные метаболиты с антибактериальной и антифунгальной активностями, среди них встречаются пептидные антибиотики, такие как пептаиболы и пептабиотики, а также малые циклические пептиды. Количество получаемых соединений этого класса постоянно растет [1]. Большинство биологически активных пептидов (БАП) содержат 2-20 аминокислотных остатков, однако, некоторые содержат больше. Как правило, БАП обладают высоким сродством к тканям, меньшей токсичностью и лучшей стабильностью [2].

С целью получения белково-пептидных экстрактов были выбраны два вида базидиомицетов - *Hypsizygus ulmarius* и *Pleurotus eryngii*. Штаммы выращивали методом погруженного культивирования в жидкой питательной среде [3]. Полученную биомассу отделяли от культуральной жидкости с помощью фильтрования через лавсан, далее ее замораживали и лиофилизировали.

Высушенный (лиофилизированный) мицелий использовали для получения белково-пептидных экстрактов (БПЭ). В качестве экстрагентов использовали два различных раствора: 10% уксусную кислоту и 10 мМ tris-HCl (pH 8.0). Выбор методики с получением двух экстрактов связан с потенциальным выделением как катионных, так и анионных пептидов, что ранее было продемонстрировано на

примере растений [4].

После осаждения охлажденным ацетоном БПЭ перерастворяли в 0,1% трифторуксусной кислоте (ТФУ), далее осуществляли обессоливание (твердофазную экстракцию) с использованием полупрепаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В результате БПЭ были разделены на несвязавшиеся с колонкой компоненты («провал») и элюат, обогащенный белково-пептидным содержимым, который был смыт с колонки 60% ацетонитрилом в 0,1% водной ТФУ).

Таким образом для каждого штамма базидиомицетов были получены четыре образца для проверки их биологической активности, имеющие следующие обозначения - "провал при обессоливании водно-солевого экстракта", "элюат при обессоливании водно-солевого экстракта", провал при обессоливании водно-кислотного экстракта" и "элюат при обессоливании водно-кислотного экстракта". Тестирование на антибиотическую активность осуществляли методом диффузии из лунок в агар. Для фракций провалов использовалась концентрация 10 мг/мл, в то время как для фракций элюатов - 5 мг/мл.

В результате тестирования было установлено, что провалы двух экстрактов для обоих штаммов (*H. ulmarius* и *P. eryngii*) обладали средней антибиотической активностью в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* и *Pseudomonas aeruginosa* с зонами ингибирования активности до 17 мм. Однако среди элюатов искомый эффект был отмечен лишь для элюата водно-солевого экстракта *P. eryngii* исключительно в отношении грамположительных бактерий (*S. aureus* и *B. subtilis*) с зонами ингибирования до 14 мм. При этом во всех опытах антифунгальная активность отсутствовала.

Таким образом было показано, что БПЭ изученных штаммов может обладать антибактериальной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, кроме этого, на основе проведенного эксперимента можно предположить наличие активного БАП в экстракте *P. eryngii*. Однако каждый из экстрактов нуждается в дополнительной очистке от примесей и проверке антибактериальной активности очищенных фракций, помимо этого будет осуществлена проверка БПЭ других культур.

Список литературы

1. Lee S. J., Yeo W. H., Yun B. S., Yoo I. D. Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from Boletus *spp.* // Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society, 1999, V. 5.

№. 8. P. 374-378.

2. Zhou R. Liu Z. K., Zhang Y. N., Wong J. H., Ng T. B., Liu F. Research progress of bioactive proteins from the edible and medicinal mushrooms. // Current Protein and Peptide Science. 2019. V. 20. №. 3. P. 196-219.

3. Автономова, А. В., Краснопольская Л. М. Оптимизация состава питательной среды для погруженного культивирования *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. // Микробиология. 75.2. 2006. С. 186-192.

4. Barashkova A.*S. a*nd Rogozhin E.A. Isolation of antimicrobial peptides from different plant sources: Does a general extraction method exist? // BMC Plant Methods, 2020, V. 16. P. 1-10.

ВЛИЯНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА НА СИНТЕЗ ПРОТЕАЗ МИКРОМИЦЕТОМ *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Насибов Э.М., Никитина З.К.
Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений, Москва

Протеазы являются химическими катализаторами биологических систем. Они позволяют организмам избирательно и эффективно катализировать важнейшие биохимические реакции. Кроме того, они обладают исключительной способностью ускорять целевые химические реакции, которые протекает в водных растворах при очень мягких условиях температуры и pH [1]. Активность одного или нескольких ферментов нарушается при многих заболеваниях [2]. В связи с этим многие протеолитические препараты были разработаны с целью воздействия на ферментативные системы при патологических состояниях [3].

Источниками протеаз являются животные, растения и микроорганизмы. Значительный интерес к протеазам микроорганизмов связан с рядом преимуществ при их использовании [4]: неограниченные источники получения; высокие скорости роста, определяющие возможные темпы производства; отсутствие влияния климатических факторов [5]. Кроме того, учитывая различные условий среды, из которой выделены изоляты, можно получать ферменты с желаемыми характеристиками [6]. Например, для синтеза термостабильных протеаз, перспективно использование термофильных бактерий, растущих в горячих источниках [7]. Короткое время генерации и относительно простой геном обеспечивают возможность генетических манипуляций с микроорганизмами [8], что, в свою очередь, открывает перспективы

для получения «индивидуальных» ферментов с желаемыми свойствами. Одной из проблем при работе с животными является наличие этических проблем, которые отсутствуют в случае протеаз микробного происхождения [19]. Способность микробов продуцировать внеклеточные ферменты еще больше упрощает способы их получения, как в лабораторных условиях, так и в производственном процессе [10]. Возможность использования при культивировании продуцентов относительно дешевых субстратов или даже отходов также обеспечивает дальнейшее повышение экономичности [11]. Ранее нами на основании оценки параметров роста и протеолитической активности мицелиальных грибов при глубинном культивировании в качестве перспективного продуцента был выбран микромицет *Aspergillus fumigatus* F 22 из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЛАР [12].

Цель работы – изучить влияние количественного и качественного состава посевного материала на секрецию протеаз микромицетом *Aspergillus fumigatus*.

Объектом исследования являлся микромицет *Aspergillus fumigatus* F 22 из коллекции ФГБНУ ВИЛАР. Для выращивания спорового материала использовали агаризованную среду Чапека-Докса

При проведении глубинного культивирования посевным материалом служила или суспензия спор гриба (5х106 спор на мл среды) или вегетативный мицелий, выращенный в течение 2 суток на жидкой питательной среде Чапека-Докса и добавленный в концентрации 5 или 10% к модифицированной среде. Культивирование осуществляли в колбах объемом 600 мл с 100 мл питательной среды на качалке при скорости вращения 220 об/мин при 260С с использованием жидкой модифицированной среды с частичной заменой сахарозы на коллаген (0,5% сахарозы и 1,5% коллагена). Через каждые сутки отбирали пробы, которые фильтровали через мембранный фильтр Minisart NLM (Sartorius) с диаметром пор 0,2 мкм. В фильтратах культуральной жидкости определяли концентрацию белка по Лоури и общую протеолитическую активность (ПЕ) по методу Ансона [13]. Удельную протеолитическую активность рассчитывали как отношение ПЕ на мг белка.

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с помощью пакета статистических программ Microsoft Office Excel 2010, рассчитывая доверительные интервалы для уровня значимости $p \leq 0,05$.

Проведенные эксперименты показали, что способ инокуляции существенно влиял на активность секретируемых протеаз микромицетом. Так (рис. 1), на 3-5 и 9 сутки культивирования протеолитическая активность в фильтратах культуральной жидкости была статистически значимо выше при использовании в качестве посевного материала спор по сравнению с вегетативным мицелием. При засеве 5 и 10% мицелием наблюдались

два максимума секреции протеаз на 4 и 7 сутки. При этом существенных различий при использовании двух концентраций вегетативного материала обнаружено не было. Следует отметить, что на 7 сутки ферментации не зафиксировано статистически значимых различий протеолитической активности при трех способах инокуляции.

Рис.1. Протеолитическая активность (ПЕ/мл) *A. fumigatus* при различных способах инокуляции (5%, и 10% - концентрация мицелия, концентрация спор - 5х106 спор/мл среды)

Несколько другая ситуация наблюдалась при анализе удельной протеолитической активности в фильтратах культуральной жидкости (Рис. 2). При использовании в качестве посевного материала мицелия также фиксировались два максимума ПЕ/мг на 4 и 7 сутки. При этом в последнем случае активность была в 1,3 раза выше для 10% вегетативного материала по сравнению с 5%. Еще ниже в эти же сроки была удельная протеолитическая активность при инокуляции спорами, которая составляла только 30% от максимальной. На 4 сутки культивирования статистически значимых различий ПЕ/мг для трех вариантов инокуляции не обнаружено.

Рис. 2. Удельная протеолитическая активность (ПЕ/мг) *A. fumigatus* при различных способах инокуляции (5%, и 10% - концентрация мицелия, концентрация спор - 5х106 спор/мл среды)

Сравнение максимальных значений протеолитической и удельной протеолитической активности *A. fumigatus* показало (табл. 1), что на ранних этапах культивирования значительная секреция протеолитических

ферментов наблюдается при засеве спорами, тогда как дальнейшая ферментация приводила либо к сравнению протеолитической активности, либо к преобладанию указанных показателей при использовании мицелия. Следует отметить. что в процессе ферментации могут происходить не только количественные, но и качественные изменения секретируемых белков, что требует дальнейшего детального изучения.

Таблица 1. Максимальная протеолитическая активность *A. fumigatus* при различных способах инокуляции.

Способ инокуляции	ПЕ/мл	Время, сутки	ПЕ/мг	Время, сутки
5% мицелий	68,4±5,7	7	18.8±1.5	7
10% мицелий	70,2±5,5	7	23,6±1,9	7
Споры	101,1±9,0	3	15,2±1,1	4

Выводы. Полученные результаты позволяют целенаправленно менять количественные и качественные характеристики секреции внеклеточных протеаз мицелиального гриба *A. fumigatus* с помощью использования различных вариантов инокуляции посевного материала.

Список литературы

1. Adamson C., Kanai M. Integrating abiotic chemical catalysis and enzymatic catalysis in living cells. // Org. Biomol. Chem. - 2021;. 19: 37–45.

2. Chaturvedi S., Singh A.K., Keshari A.K., et al. Human metabolic enzymes deficiency: A genetic mutation based approach. // Scientifica - 2016; https://doi.org/10.1155/2016/9828672

3. de la Fuente M., Lombardero L., G mez-Gonz lez A., et al. Enzyme Therapy: Current Challenges and Future Perspectives/ // Int. J. Mol. Sci. - 2021; 22: 9181-9201..

4. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK., Microbial enzymes: industrial progress in 21st century // 3 Biotech – 2016; 6:174.

5. Bhatia RK, Ullah S, Hoque HZ, Ahmad I, Yang YH, Bhatt AK, Bhatia SK., Psychrophiles: a source of cold-adapted enzymes for energy efcient biotechnological industrial processes // J Envir Chem Eng – 2021; 9:104607.

6. Putatunda C, Kundu BS, Bhatia R., Purifcation and characterization of alkaline protease from *Bacillus sp.* HD292 // Proc Natl Acad Sci India B Biol Sci – 2019; 89:957–965.

7. Sahay H, Yadav AN, Singh AK et al., Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes // 3 Biotech – 2017; 7:118.

8. Ali N, Ullah N, Qasim M, Rahman H, Khan SN, Sadig A et al., Molecular characterization and growth optimization of halotolerant protease producing

Bacillus subtilis Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan // Extremophiles – 2016; 20:395–402.

9. da Silva RR., Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications // Appl Biochem Biotechnol – 2017; 183:1–19.

10. Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A, Ashraf M., Microbial proteases applications // Front Bioeng Biotechnol – 2019; 7:110.

11. Limkar MB, Pawar SV, Rathod VK., Statistical optimization of xylanase and alkaline protease co-production by *Bacillus sp.* using Box-Behnken Design under submerged fermentation using wheat bran as a substrate // Biocatal Agric Biotechnol – 2019; 17:455–464.

12. Никитина ЗК, Гордонова ИК, Насибов Э.М. Изучение протеолититческой и коллагенолитической активности мицелиальных грибов в процессе глубинного культивирования. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.- 2022; 25(9): 16 21.

13. Кусакина М.Г., Суворов В.И., Чудинова Л.А. Большой практикум «Биохимия». Лабораторные работы: учеб. пособие. // Перм. гос. нац. исслед. ун-т.- Пермь - 2012.- 148 с.

АНТИБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛИХЕНИЗИРОВАННХ ГРИБОВ

Пчелкин А.В.
Институт географии РАН, Москва

Создание новых антибиотиков - одна из важнейших задач фармацевтики и медицины, что обусловлено появлением штаммов, устойчивых к определенным препаратам, например, резистентных штаммов золотистого стафилококка или бактериальной дизентерии. На сегодняшний день в нашей стране, большинство возбудителей наиболее распространенных инфекций устойчивы к таким препаратам как: бисептол, гентамицин и препаратам группы тетрациклинов. Кроме того, разработка отечественных препаратов является необходимым условием импортозамещения, что отражено в Государственной программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности», где говорится, что к концу 2030 г. ожидается увеличение до 90 % доли стратегически значимых лекарственных средств, полный цикл производства которых осуществляется на территории России. Эта программа базируется на национальных целях развития РФ на период до 2030 г., сформулированных в Указе Президента РФ от 21.07.2020 № 474, а также целевых показателях, характеризующих достижение этих целей к указанному сроку. В этом плане крайне важно иметь своего

рода резервный задел потенциальных антибиотиков, которыми можно было бы оперативно заменить те препараты, для производства которых требуется приобретение зарубежных патентов, особенно на синтетические препараты. Одним из таких резервных заделов являются лихенизированные грибы, продуцирующие вторичные метаболиты, обладающие антибиотическими свойствами [1]. Наиболее распространенным препаратом, выделяемым из лихенизированных грибов и обладающим антибиотическими свойствами широкого спектра действия, является усниновая кислота и ее производные, которая содержится во многих видах лихенизированных грибов [2]. Усниновая кислота – наиболее изученный вторичный метаболит лишайников. Однако помимо нее существует большое число других лишайниковых веществ, потенциально пригодных для производства антибиотиков и противораковых препаратов. Причем в качестве источников лишайниковых веществ нужно учитывать не только виды лишайников, произрастающих на территории России, но и в других странах, т.к. такие виды могут быть использованы для получения российских патентов. Так, простейший представитель лишайниковых кислот структурного типа депсидонов - антибиотик физодовая кислота, проявляющую цитотоксическую активность в отношении клеточных линий MDA-MB-231, MCF-7 T-47D рака молочной железы и гепатобластомы [3], содержится в одном из массовых видов эпифитных лишайников средней полосы России – *Hypogymnia physodes*, перспективном виде для получения антибиотика вследствие массовости и широкого распространения, а также удобства сборов. Этот антибиотик содержат и другие виды лишайников: *Allantoparmelia alpicola* (Th. Fr.) Essl. – в России отмечен в Арктической области и на севере Европейской части, на южном и северном Урале, Сибири (Арктика, Восточная и Южная части), на севере и арктической частях Дальнего Востока; *Hypogymnia bitteri* (Lynge) Ahti – распространен в Европейской части России, на Кавказе, в Сибири и на Дальнем Востоке; *Hypogymnia farinacea* Zopf – Европейская часть России, Урал, Восточная и Арктическая Сибирь, Кавказ; *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav. – вид широко распространен в России, в центральной части довольно редок и даже включен в Красную книгу Москвы, но в северных районах обычен; *Hypogymnia vittata* (Ach.) Parrique – вид обычен в северных районах [4], как правило, встречается совместно с *Hypogymnia physodes* на коре деревьев, довольно удобен для сборов талломов; *Hypogymnia submundata* (Nyl.) Oxner ex Rass. – вид отмечен для Приморского и Хабаровского края, о-ва Сахалин; физодовую

кислоту содержат и другие виды рода *Hypogymnia*, но из-за редкости не представляют интереса; *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf – вид в некоторых районах нередок и может также рассматриваться в качестве потенциального источника физодовой кислоты. Лишайниковое вещество париетин, обладающий антибиотическими свойствами, содержится в широко распространенном эпифитном лишайнике *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. – этот нитрофильный токсикотолерантнй лишайник встречается и в урбанизированных районах, но интерес представляют фоновые, малозагрязненные районы, где вид обычен на коре и ветвях осины, часто являясь доминирующим. Положительной чертой *Xanthoria parietina* является то, что вид обладает характерными признаками и легко идентифицируем даже неспециалистами, что позволяет привлекать для его сборов малоквалифицированную рабочую силу. В арктических и горных районах обычным массовым видом является также хорошо идентифицируемый эпилитный лишайник *Xanthoria elegans* (Link) Th. Fr. Он содержит, помимо париетина, телосхистин, фаллациал, париетиновую кислоту. Этот лишайник довольно слабо прикрепляется к субстрату, что облегчает его сборы. Депсид орселлиновой кислоты - леканоровая кислота является специфическим лишайниковым метаболитом, обусловливающим ее бактерицидное и антиоксидантное действие. Леканоровая кислота содержится в широко распространенном чешуйчатом лишайнике Hypocenomyce scalaris (Ach.) M. Choisy. Этот лишайник часто является доминирующим на коре березы, он менее удобен для сборов, чем листоватые или кустистые виды, но представляет интерес именно вследствие своей массовости. *Melanelixia glabra* (Schaer.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch – эпифитный листоватый лишайник, также содержит леканоровую кислоту, обычен в лесостепной зоне, преимущественно на дубах и буках; *Parmelina quercina* (Willd.) Hale – листоватый эпифитный вид, содержащий леканоровую кислоту, произрастает в зоне широколиственных лесов, обычен для дубовых и смешанных равнинных и горных лесов. В качестве источника антибиотиков наиболее перспективны массовые, местами доминирующие эпигейные виды лишайников, удобные как для сбора, так и для восстановления в случае снижения численности: *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. – не только как источник усниновой, но и фумарпротоцетраровой кислоты; вид обычен на почве в сухих борах, светлых таежных лесах, на верховых болотах. *Cladonia rangiferina* (L.) Weber и *Cladonia stygia* (Fr.) Ruoss – источники атранорина и

фумарпротоцетраровой кислоты; виды широко распространены, на почве в сосновых лесах, таежных лесах, на верховых болотах, довольно хорошо идентифицируемы. *Nephromopsis cucullata* (Bellardi) Divakar, A. Crespo & Lumbsch – источник не только усниновой, но и протолихестериновой кислоты; эпигейный вид, произрастает в арктической зоне и более обычен в азиатской части России, в тундре и в горах, легко идентифицируем и пригоден для сбора. Из кустистых эпифитных лишайников для получения фумарпротоцетраровой кислоты перспективный вид *Bryoria fuscescens* (Gyeln.) Brodo & D. Hawksw. Этот лишайник является одним из доминантов в северных лесах, встречается на коре и ветвях хвойных, реже лиственных пород, удобен для сбора. В качестве источника барбатоловой и алекториаловой кислот перспективен кустистый эпифитный лишайник *Bryoria capillaris* (Ach.) Brodo & D. Hawksw. – этот вид легко отличить от других представителей рода по светлой окраске и химическим реакциям, нередок в северных лесах, часто произрастает совместно с предыдущим видом. В качестве источника усниновой, эверновой кислот и атранорина очень интересен кустистый эпифитный лишайник *Evernia prunastri* (L.) Ach.; вид произрастает на коре и ветвях преимущественно лиственных пород, довольно широко распространен, часто является массовым, удобен для сбора и идентификации. Близкий вид, *Evernia mesomorpha* Nyl., может служить источником получения диварикатовой кислоты; этот лишайник также широко распространен – от Мурманской и Архангельской областей до Приморского края, Камчатки и Сахалина, чаще встречается в северных районах [5]. В качестве источника лишайниковых веществ кустистые эпигейные и эпифитные виды лишайников наиболее перспективны, т.к. помимо удобства сбора, позволяют минимизировать загрязнение собранного материала. В лишайниках выявлено более 300 лишайниковых веществ [6], большая часть которых обладает антибиотическими и противораковыми свойствами, что обусловливает большой антибиотический потенциал лихенизированных грибов как источников получения препаратов для замены тех лекарств, к которым выработалась резистентность патогенных микробов и для импортозамещения.

Список литературы

1. Пчелкин А.В., Кухта А.Е. Антибиотики лихенизированных грибов и проблема антибиотикорезистентности //Успехи медицинской микологии. – 2019. – Т.20. – С. 513-518.

2. Вайнштейн Е.А., Равинская А.П., Шапиро И.А. Справочное пособие по хемотаксономии лишайников. - Л. – 1990. - 153 с.

3. Lichen Secondary Metabolites. Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential /Ed. By Rankovi , Springer. – 2015. – 202 pp.

4. Список лихенофлоры России. – СПб. – Наука. – 2010. – 194 с.

5. Определитель лишайников России. Вып.6. Алекториевые, Пармелиевые, Стереокаулоновые. – СПб. – Наука. – 1996. – 203 с.

6. Флора лишайников России: Биология, экология, разнообрзие, распространение и методы изучения лишайникогв /Отв. ред. Андреев М.П., Гимельбрант Д.Е. – М.: КМК. – 2014. – 312 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ОБРАЗЦОВ ИЗ ЧАГИ *INONOTUS OBLIQUUS* НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

Петровская И.Ф., Колосова И.В., Теплякова Т.В., Непомнящих Т.С.
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово

Род Orthopoxvirus семейства Poxviridae широко известен двумя представителями - вирусом натуральной оспы (ВНО), возбудителем натуральной оспы, одного из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека, и вирусом осповакцины (ВОВ), с помощью которого были проведены миллиарды вакцинаций людей и осуществлена всемирная победа над натуральной оспой. В состав рода также входят такие патогенные для человека зоонозные вирусы, как вирус оспы обезьян (ВОО) и вирус оспы коров (ВОК) [1].

Прекращение вакцинации против оспы более 40 лет назад и последующая потеря коллективного иммунитета у людей не только против оспы, но и против других ортопоксвирусных инфекций способствует увеличению распространения зоонозных ортопоксвирусов среди людей. Это, в свою очередь, может способствовать естественному отбору высокопатогенных и эпидемических штаммов вируса. Поэтому важно продолжать исследования с целью создания новых безопасных и высокоэффективных средств профилактики и лечения ортопоксвирусных инфекций, при этом также важно, чтобы запасы новых терапевтических средств были широко доступны и в достаточных количествах для эффективного лечения возникающих биологических угроз [2].

Впервые в России были проведены исследования на ВНО из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор». Было показано, что водные экстракты из чаги *Inonotus obliquus* проявляют противовирусный эффект в отношении этого патогена, а также ВОВ [3].

Цель работы - исследование противовирусной активности образцов из чаги *Inonotus obliquus* на культуре клеток Vero в отношении ВОВ с определением их противовирусной эффективности при использовании двух схем внесения препаратов и ВОВ: профилактической и лечебной. Образцы, проверенные в отношении ВОВ, с учетом результатов также проводимых нами исследований в отношении зоонозных вирусов, будут рассматриваться как перспективные для разработки препаратов от ортопоксвирусов и в дальнейшем будут исследованы in vivo.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали штамм вируса осповакцины (ВОВ) Л-ИВП, полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Концентрация вируса, использованного в работе, составляла 2,45 107 БОЕ/мл. В предварительных экспериментах на культуре клеток Vero была подобрана минимальная доза ВОВ, вызывающая 100% ЦПД в лунке, 1000 БОЕ/лунку.

Клеточные культуры. В работе использовали перевиваемую линию клеток Vero E6 (клетки почки африканской зеленой мартышки), полученную из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Подготовка образцов. Для исследования были использованы водные экстракты природной чаги, меланина из чаги и гуминовых кислот из чаги, технология их подготовки представлено в патентах [4-6]. Масса сухого вещества в каждом экстракте составляла 2 мг/мл.

Противовирусная эффективность исследуемых образцов оценивалась по изменению инфекционности ВОВ (титра) в монослое клеток Vero E6.

Профилактическая схема. На монослой культуры клеток вносили по 0,1 мл образца и помещали в термостат на 2 часа при температуре +370С, затем вносили по 0,1 мл ВОВ в количестве 1000 БОЕ/лунка.

Лечебная схема. Заражение клеточного монослоя осуществляли ВОВ в объеме 0,1 мл в количестве 1000 БОЕ/лунка. Планшет с внесенным вируссодержащим материалом помещали в термостат на 1 час при +37°С для адсорбции вируса на культуру клеток, затем в лунки вносили разведения образца в объеме 0,1 мл.

Конечная концентрация образцов в лунке была 300, 100, 33,33,

11,11 и 3,70 мкг/мл. Каждая схема применения образцов in vitro была воспроизведена в 4 повторах.

Метод определения 50%-цитотоксических и 50%-ингибирующих ВОВ концентраций образцов. Оценку противовирусной эффективности препаратов проводили по адаптированной и модифицированной нами методике [7]. В лунки 96-луночных планшетов, содержащих монослой клеток Vero E6, сначала вносили по 0,1 мл серийных разведений исследуемых соединений и по 0,1 мл разведения штамма ВОВ в дозе 1000 БОЕ/лунку в соответствии со схемой внесения. Токсическая активность соединений определялась по гибели клеток под воздействием препарата в лунках планшета, в которые вирус не вносили. В качестве контролей использовали монослои клеток в лунках планшета, в которые вносили вирус без соединений (контроль вируса) и монослои клеток в лунках, в которые не вносили ни вирус, ни соединения (контроль культуры клеток). После инкубирования в течение 4 суток монослой клеток прокрашивали витальным красителем нейтральным красным, затем удаляли краситель, добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированное живыми клетками монослоя, оценивали по оптической плотности (ОП), которая являлась показателем количества неразрушенных под влиянием вируса клеток в монослое. ОП измеряли на планшетном ридере “MultiskanFS” (ThermoScientific, США) при длине волны 490 нм. Учет результатов проводили с использованием планшетного спектрофотометра Emax, и компьютерной программы «SoftMaxPro 4.0», результаты ОП представляли в полулогарифмической системе координат. На основании полученных данных рассчитывали ЦТД50 и ЭД50 для исследуемых препаратов, где ЦТД50 - величина концентрации определённого образца препарата в лунке планшета, под воздействием которого разрушается 50% клеточного монослоя; ЭД50 - величина концентрации определённого образца препарата в лунке планшета, под воздействием которого сохраняется 50% жизнеспособного клеточного монослоя. Полученные данные дают возможность рассчитать химиотерапевтический индекс (ХТИ) препарата по формуле: ХТИ=ЦТД50/ЭД50. Препараты с ХТИ>10 считали высокоактивными, а препараты с ХТИ<2 не активными, препараты с TI между 2 и 10 считали средне активными [7]. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Противовирусная активность образцов из чаги *Inonotus obliquus*.

Код образца	Вещество, примечание	Схема применения	$ЦТД_{50}$, мкг/мл	$ЭД_{50}$, мкг/мл	ХТИ
20-15	Экстракт чаги	Лечебная	>300	115	3
		Профилактическая	>300	83	36
20-17	Экстракт чаги	Лечебная	>300	112	35
		Профилактическая	>300	80	59
20-24	Меланин из чаги	Лечебная	135	53	4
		Профилактическая	82	38	3
20-61	Гуминовые кислоты из чаги	Лечебная	>300	113	6
		Профилактическая	>300	89	5

Результаты и обсуждение

Чага *Inonotus obliquus* содержит широкий спектр различных биологически активных веществ (БАВ). Для исследования противовирусной активности в отношении ВОВ были выбраны образцы, полученные разными способами [4-6].

Как видно из таблицы 1, исследуемые образцы 20-15, 20-17 и 20-61 не являются токсичными для монослоя культуры клеток Vero E6 в разведении от 300 и более мкг/мл, но образец 20-24 проявил цитотоксическое действие при содержании от 82 мкг/мл. Меланин, как и гуминовые кислоты, входит в состав хромогенного полифенолоксикарбонового комплекса чаги *Inonotus obliquus*, но образец 20-61, в отличие от 20-24, получен с обработкой трипсина для уменьшения токсических веществ, что и было показано для Vero E6.

Все образцы показали противовирусную активность в отношении ВОВ штамма Л-ИВП от средне- до высокоактивной в двух схемах применения. Выраженное противовирусное действие проявили водные экстракты, особенно при профилактической схеме применения, когда ХТИ для образца 20-15 увеличился более, чем в 10 раз, а для образца 20-17 – в 1,5 раза. По-видимому, менее продолжительная пробоподготовка водных экстрактов позволяет сохранить максимальное количество БАВ чаги, обладающих противовирусной активностью в отношении ВОВ. Данные эксперименты проводились в 4 повторах с интервалом в 1 неделю.

Таким образом, все образцы, проверенные в отношении ВОВ in vitro, могут рассматриваться как перспективные. Необходимо дальнейшее

изучение гриба чаги *Inonotus obliquus* и отдельных ее компонентов с целью разработки эффективной технологии получения и выделения БАВ и дальнейшего создания на их основе лекарственных и профилактических препаратов против заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ГЗ-29/21 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Список литературы

1. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. New York: Springer; 2005. 425 p.
2. Shchelkunova, G.A.; Shchelkunov, S.N. Smallpox, Monkeypox and Other Human Orthopoxvirus Infections. Viruses 2023, 15, 103. https://doi.org/10.3390/v15010103.
3. Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А. и соавт. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. Вып. 3(113). С. 99-101.
4. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О. и соавт. Ингибитор репликации коронавируса SARS- CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus* obliguus. Патент РФ № 2741714, 28.01.2021 г. Бюл. № 4.
5. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О. и соавт. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе меланина из гриба *Inonotus obliquus*. Патент РФ № 2747018, опубл. 23.04.2021 г. Бюл. № 12.
6. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О. и соавт. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе гуминовых веществ. Патент РФ № 2752872, опубл. 11.08.2021 г. Бюл. № 23.
7. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. Antiviral Research. 2003; Vol. 57(1-2): 13-23.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА КУЛЬТИВИРУЕМОГО МИЦЕЛИЯ БАЗИДИОМИЦЕТА *FOMES FOMENTARIUS*

Проценко М.А., Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Серова О.А., Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А.
ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово

Одной из ведущих причин смертности на Земле являются заболевания, вызываемые вирусами. Среди острых респираторных

вирусных инфекций одним из наиболее опасных и смертоносных заболеваний является грипп. Данный вирус имеет высокий пандемический потенциал. В настоящее время известно более 25000 серотипов вируса гриппа, различающихся между собой антигенным спектром, и в будущем их число будет скорее всего возрастать.

Заболевания, вызываемые вирусами простого герпеса, также в настоящее время занимают одно из лидирующих мест среди вирусных заболеваний человека. Заражение вирусами простого герпеса в последние годы составляет 75,0–95,0 % населения Земли.

Существующие на сегодняшний день противовирусные препараты вследствие постоянно протекающих мутаций вируса гриппа в ближайшее время могут снизить или вовсе потерять свою эффективность.

Высшие базидиомицеты представляют значительный интерес в качестве источников лечебных и профилактических средств с широким спектром биологической активности. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в течение нескольких лет ведутся работы по поиску и разработке новых противовирусных препаратов, как на основе плодовых тел, так и культивируемого мицелия базидиальных грибов.

Исследования прошлых лет показали, что биологически активные вещества базидиального гриба *Fomes fomentarius* (L.) Fr. способны проявлять противовирусную активность. Например, водорастворимый меланин-глюкановый комплекс гриба обладал противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1 [1]. Выявлено, что биомасса *Fomes fomentarius* показала активность в отношении вируса гриппа штамма A/FM/1/47(H1N1) [2].

Объектом настоящего исследования является культивируемый глубинным способом *Fomes fomentarius* Кр-112, штамм депонированный под номером F-1261 в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Выращивание мицелия гриба в погруженной культуре осуществляли в глюкозопептонной среде, поскольку именно на этой среде, как правило, выращивают *Fomes fomentarius* в глубинной культуре [3]. Состав среды: глюкоза – 30,0 г/л; пептон – 5,0 г/л; дрожжевой экстракт – 2,0 г/л; дигидрофосфат калия – 1,0 г/л; сульфат магния – 0,5 г/л.

Получение посевного твердофазного мицелия осуществляли на питательных средах с тем же составом, но с добавлением 2 % агара, во флаконах, емкостью 500 мл. Через 7 суток культивирования разделяли стерильной иглой питательные среды с молодым мицелием на 4

части и добавляли во флаконы по 80 мл жидкой питательной среды с соответствующим составом, но без агара. Жидкофазный посевной мицелий нарабатывали в течение 3 суток на ротационных качалках со скоростью вращения 190 об/мин и температуре 26±2 °С. По истечении этого срока инокулят глубинной культуры использовали в качестве посевного материала в объеме 20%.

Процесс глубинного культивирования мицелия *Fomes fomentarius* проводили в колбах вместимостью 500 мл в 100 мл питательной среды на ротационной качалке при скорости вращения 190 об./мин, температуре 26±2 °С в течение 5-7 суток. После окончания культивирования грибную биомассу мицелия отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, промывали ее дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С. Высушенный мицелий гриба измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, измеряли массу сухого мицелия и рассчитывали содержание сухой биомассы мицелия. Содержание сухой биомассы мицелия в культуральной жидкости составило 3,8±0,2 г/л.

Из мицелия получали экспериментальный образец препарата методом четырехкратной экстракцией 70 % этиловым спиртом при температуре 60 °С и соотношении сырья к экстрагенту 1:50. После окончания каждого этапа экстракции смесь фильтровали через стеклянный фильтр. Жидкие извлечения объединяли, упаривали и досушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С до влажности 5 % [4].

Полученный экстракт очищали для получения фракций, содержащих группы биологичкски активных веществ. Образец, содержащий в своем составе преимущественно белки и полисахариды получали растворением сухого экстракта в растворе хлорида натрия с последующим осаждением сульфатом аммония, диализом и сушкой [5,6].

Для получения образца, содержащего преимущественно фенольные соединения, в том числе флавоноиды, этанольный экстракт растворяли в этилацетате, раствор отделяли от осадка и высушивали до удаления органического растворителя [7,8].

Экстракт исследовали на токсичность и противовирусную активность. Изучение противогерпетической активности проводили на перевиваемой культуре клеток Vero в отношении вируса простого герпеса 1-го (штамм VR-3) и 2-го типа (штамм MS). Определяли титры вируса в контроле и в опыте и высчитывали индекс нейтрализации вируса под влиянием экстрактов. Индекс нейтрализации вируса

простого герпеса 2-го типа под действием этанольного экстракта гриба составлял 2,0 lg.

Тестирование противогриппозной активности сухого этанольного экстракта проводили в перевиваемой культуре клеток MDCK и на аутбредных мышах популяции ICR массой 14–16 г, полученных из Питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [9]. В экспериментах in vitro противовирусную активность экстрактов *Fomes fomentarius* в отношении вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) определяли по их способности ингибировать инфекционность вируса гриппа в зараженных клетках в сравнении с таковой в контрольной инфицированной культуре [10]. Индекс нейтрализации вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) под действием этого экстракта составил 2,0 lg. Однако, очищенные образцы, выделенные из этого экстракта показали достоверное снижение титра вируса гриппа штамма A/Aichi/2/68 (H3N2), но не штамма A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Индексы нейтрализации вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) под действием образца, содержащего фенольные соединения, и образца, содержащего белки и полисахариды, составили 4,0 lg и 1,75 lg соответственно.

Исследование противовирусной активности in vivo этанольного экстракта *Fomes fomentarius* в отношении штамма A/Aichi/2/68 (H3N2), показало, что введение мышам образца экстракта до заражения вирусом гриппа и после заражения в течение 5 суток вызывало их значительную защиту по сравнению с контрольными животными (без введения препаратов). Так, при введении грибного экстракта выживаемость мышей составила 80%, коэффициент защиты – 60%, а средняя продолжительность их жизни – 14,8±2,5 суток, что было достоверно выше соответствующих показателей в контрольной группе животных (без введения препаратов), в которой выживаемость и средняя продолжительность жизни мышей составили 20 % и 10,5±3,7 суток соответственно. Следует отметить, что этот экстракт не проявлял заметного вирусингибирующего эффекта в отношении данного штамма вируса гриппа в культуре клеток MDCK.

Исходя из результатов исследований, нами сделан вывод, что экстракт мицелия *Fomes fomentarius* может стать новым источником для разработки эффективных и безопасных лекарственных препаратов для лечения заболеваний, вызываемых вирусами гриппа и простого герпеса.

Список литературы

1. Seniuk O.F., Gorovoj L.F., Beketova G.V. et al. Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. (Aphyllophoromycetideae) // Int. J. Med. Mushrooms. – 2011. – V. 13. – №1. – P. 7-18.

2. Круподерова Т.А., Барштейн В.Ю., Рыбалко С.Л. Противовирусная активность мицелия базидиальных грибов в отношении вируса гриппа в экспериментах in vitro // Успехи медицинской микологии. – 2014. Т. 12. – С. 312-314.

3. Chen W., Zhao Z., Li Y. Simultaneous increase of mycelial biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function of gastric cancer intervention // Carbohydrate Polymers. – 2011. – V.85. – P. 369–375.

4. Проценко М.А., Костина Н.Е., Теплякова Т.В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба Daedaleopsis tricolor (Bull.) Bondartsev et Singer // Биотехнология. – 2018. – Т. 34. – №1. – С. 45–51. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-1-45-51.

5. Патент 2524425 C2 (РФ) L-фукоза 1 6 Специфичный лектин / Кобаяши Ю., Хирабаяши Ю., Татено Х., Кавагиши Х., Дохра Х. // 2014. Бюл. № 21.

6. Лебедев Л.Р., Теплякова Т.В., Вязовая Е.А., Даниленко Е.Д. Способ получения экстрактов с противоопухолевой активностью из Daedaleopsis confragosa К-1326 // Биотехнология. 2019. Т.35. №1. С. 68-72. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-68-72.

7. Khushbaktova Z.A., Yusupova S.M., Badal'yants K.L., Syrov V.N., Batirov E.Kh. Isolation of hispidin from a walnut-tree fungus and its antioxidant activity // Chemistry of Natural Compounds. 1996. Vol. 32. N1. DOI: 10.1007/BF01373783.

8. Патент 2530637 C1 (РФ) Способ получения фракции фенольных веществ из чаги / Сысоева М.А., Хабибрахманова В.Р., Кыямова Г.И. // .2014. Бюл. № 28.

9. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Washington: D.C.: National Akademy Press, 1996. 138 с.

10. Мазуркова Н.А., Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Лобанова И.Е., Высочина Г.И. Высшие растения как основа для разработки противогриппозных препаратов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. №4. С. 55–56.

НОВЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ И СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Садыкова В.С.[1], Куварина А.Е.[1], Рошка Ю.А.[1], Кураков А.В.[2], Георгиева М.Л.[1,2]

[1]НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

[2]МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

Антимикробные соединения, выделенные из экстремофильных грибов с различными типами адаптации, представляют собой обширное поле для научной деятельности. Разнообразие вторичных метаболитов таких грибов значительно больше, чем у микромицетов – обитателей экотопов со щадящими условиями. Для успешного роста и жизнедеятельности в экстремальных условиях организмы могут вырабатывать оригинальные метаболиты, среди них часто обнаруживают соединения неустановленного биогенеза и продукты присоединения или отщепления «структурных фрагментов» известных антибиотиков с неописанной ранее активностью. Считается, что метаболиты, возможно, действуют как средства адаптации и как химическая защита грибов, конкурирующих за субстрат.

В лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» создана коллекция морских экстремофильных грибов – продуцентов антибиотиков, выделенных из разных экстремальных экотопов с разными механизмами адаптации (психрофиллы, галофильные и галотолерантные, алкалофильные). В качестве источников новых антимикробных пептидов выбраны алкалофильные грибы рода *Emericellopsis* в связи с наличием у них противогрибковой активности в отношении возбудителей условно-патогенных микроскопических грибов. Проведен масштабный скрининг способности к образованию и накоплению противогрибковых соединений, в частности эмерициллипсинов в разных биотехнологических системах. Полученные результаты позволяют предположить, что новые противогрибковые пептиды - эмерициллипсины могут быть использованы при создании противогрибкового средства для терапии инвазивных микозов, особенно для лечения полирезистентного аспергиллеза и криптококкоза.

У других алкалофилов - грибов *S. alkalinus* - за антимикробную

активность отвечают низкомолекулярные белки. Структурный анализ, анализ данных MALDI, MS | MS и др. позволили идентифицировать антимикробное соединение Sa-HFB1, выделенное из *S. alkalinus*, как гидрофобин класса II (Kuvarina et al., 2022б). Выход продукции Sa-HFB1 около 25,54 ± 1,4 мг/л из КЖ *S. alkalinus* на щелочной среде был достигнут за период ферментации 14 дней. Спектр антимикробной активности выявил высокую антифунгальную активность, при этом активность по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* не обнаружена. В дальнейшем был расширен спектр тест-культур за счет использования клинических изолятов дрожжевых грибов, возбудителей инвазивных кандидозов

В результате исследований также был отобран психотолерантный штамм *P. vulpinum* ИНА 01369, изучен комплекс его вторичных метаболитов, обладающих антимикробной активностью. Из концентрата мицелия и культуральной жидкости штамма *P. vulpinum* ИНА 01369 выделены индивидуальные вещества, активные в отношении фитопатогенных пектобактерий *P. savastanoi* и *P. carotovorum* VKM-B1247 и фитопатогенных грибов – возбудителей фузариозов растений. Для увеличения выхода антимикробного комплекса были апробированы поверхностное (стационарное) и глубинное с использованием шейкера-инкубатора культивирование. Для дальнейшей структурной характеристики была выбрана фракция из экстракта культуральной жидкости 290Э-39 (290Б-29) ввиду ее наибольшего выхода по сравнению с остальными. Так, в результате ее анализа методом ESI-MS был получен тотальный масс-спектр с рядом преобладающих сигналов m/z в режиме [M+H] (756.57, 782.57, 844.69 и 885.55 Да), а также некоторых минорных (718.54 и 744.56 Да. Локализован также активный компонент из экстракта мицелия с массой m/z 693 Да. Таким образом, развитие этого прикладного направления исследований очень своевременно и перспективно, и обусловлено, в том числе, медицинским и биотехнологическим значением экстремофильных грибов.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ 22-25-00353 «Разработка новых противогрибковых антибиотиков на основе антимикробных пептидов экстремофильных грибов»

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ НОВОГО ШТАММА *HERICIUM ERINACEUS* ВР16

Широких А.А., Назарова Я.И., Широких И.Г.
ФАНЦ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, Киров

Hericium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers. – съедобный гриб с лекарственными свойствами. Его использование в традиционной медицине Китая и других восточных стран имеет давнюю историю. Предполагается, что одним из основных классов биологически активных соединений *H. erinaceus* являются полисахариды. Благодаря полисахаридам *H. erinaceus* обладает иммуномодулирующей, противораковой, антиоксидантной, гастропротекторной, нейропротекторной, гепатопротекторной, антигипергликемической и гиполипидемической активностью [1, 2].

В задачи нашей работы входило выделение из природной среды нового штамма ежовика гребенчатого, его твердофазное культивирование, получение водорастворимой фракции полисахаридов и изучение их биологической активности.

Из плодового тела ежовика, собранного на стволе поваленного дуба в грабово-кисличной дубраве на территории Национального парка «Беловежская пуща» (Беларусь), методом тканевой культуры был изолирован штамм *H. erinaceus* ВР16. Фенотипическая идентификация природного изолята была подтверждена методами молекулярной филогении. В качестве наиболее близкого родственника (99,68% сходства) к изоляту БП 16 поисковым сервисом BLAST предложен депонированный в NCBA штамм *H. erinaceus* CBS 202.31_MH855186.1. Нуклеотидная последовательность фрагмента ITS1–5.8S–ITS2 *H. erinaceus* ВР16 депонирована в NCBI под номером MK809367. При культивировании штамм отличался хорошей способностью к плодообразованию: на агаровой среде на 18-20 сут роста по периферии колоний начинали появляться примордии, а затем формировались небольшие плодовые тела - базидиомы.

Для выделения полисахаридов использовали базидиомы *H. erinaceus* ВР 16, выращенного в лабораторных условиях на смеси дубовых опилок (10 об. %), зерна (30 об. %) и соломы (60 об. %) в течение 58 сут. Плодовые тела измельчали, заливали горячей (70 С) дистиллированной водой и оставляли на 8 час для экстракции, после чего полисахариды осаждали добавлением 96% этанола (1:3, V/V). Полученный осадок отделяли центрифугированием, растворяли

в дистиллированной воде, раствор лиофилизовали, получали суммарную фракцию растворимых в воде полисахаридов – ПФНЕ.

В составе ПФНЕ, после гидролиза полисахаридов 2М трифторуксусной кислотой, выявлены методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов остатки моносахаридов: галактоза, глюкоза, арабиноза, манноза, фукоза, рамноза, ксилоза в соотношении 27:26:19:14:8:7:1 соответственно [3].

Биологическую активность ПФНЕ исследовали в нескольких направлениях: в лаборатории ветеринарной иммунологии ФАНЦ Северо-Востока и в лаборатории криофизиологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН.

На модели оксидативного стресса, вызванного у белых мышей введением хлоркарбона (ХК), изучены антитоксические и антиоксидантные свойства ПФНЕ. В результате введения ХК в малых дозах в сыворотке крови белых мышей снижалось по сравнению с контрольными животными, количество ферментов диаминоксидазы (ДАО), глутатионпероксидазы (ГТП), супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), мелатонина (МТ), а количество аспарагинаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотранферазы (АЛТ) и содержание малонового диальдегида (МДА), напротив, повышалось. У животных экспериментальной группы, в отличие от контрольной группы, на 5-е сут проведения

курса инъекций ПФНЕ, отмечали прекращение снижения ДАО, ГТП, СОД, КАТ, МТ. Под

действием ПФНЕ на 10-е сут показатели ДАО, ГТП, СОД, КАТ, МТ, АСТ, АЛТ, МДА соответствовали физиологической норме. Влияние препарата на основе *H. erinaceus* на процессы активации синтеза гормона мелатонина и фермента диаминоксидазы показано впервые [4].

При сравнении безвредности и противоопухолевого действия ПФНЕ с синтетическим противоопухолевым препаратом метотрексат (инъекционный раствор) исследования проводили на белых мышах – опухоленосителях саркомы S-180, определение острой и хронической токсичности – на здоровых белых мышах и крысах. ПФНЕ активировала у мышей выработку -фактора некроза опухолей (-ФНО) и -интерферона (-ИФН). Метотрексат, напротив, снижал уровень этих цитокинов. По сравнению с метотрексатом, ПФНЕ увеличивала среднюю продолжительность жизни мышей-опухоленосителей на 23,4%, показала большее торможение роста опухоли (82,00±0,08%), чем метотрексат (75,20±0,04%), не обладала острой токсичностью в тесте на белых мышах, не вызывала изменений

их физиологического состояния и не влияла на гематологические и биохимические показатели крови животных. Тест на хроническую токсичность на крысах показал безвредность ПФНЕ, тогда как метотрексат повышал уровень аминотрансфераз, снижал количество лимфоцитов, моноцитов, тромбоцитов в крови, что проявилось в виде аллергических и токсических реакций у животных [5].

Проводили оценку возможности частичной замены антибиотиков на ПФНЕ при лечении клинических маститов у коров. Исследования проводили на животных черно-пестрой породы, больных клиническим гнойно-катаральным маститом стафилококковой этиологии. ПФНЕ использовали в виде раствора (500 мг субстанции полисахарида на 1000 мл физиологического раствора), после мембранной стерилизации, вводили интрацистернально по 5 мл, 1 раз в сутки в течение 7 дней и, дополнительно, подкожно по 8 мл, 1 раз в сутки в течение 7 дней. Кроме раствора ПФНЕ коровам подкожно вводили антибиотик цефтонит в дозе 1 мл на 50 кг массы, один раз в сутки в течение 5 сут [6].

Установлено, что введение больным животным ПФНЕ через 10 дней лечения повышало на 30% количество выздоровевших, по сравнению с антибиотикотерапией. ПФНЕ нормализовала количество соматических клеток в молоке до физиологического уровня, снижала уровень Il-2 и Il-8, простогландинов Е2, нормализовала СОЭ и фагоцитарную активность в крови экспериментальных животных. Молоко после лечения коров ПФНЕ было годно к пищевому употреблению на 72 часа раньше, чем при антибиотикотерапии.

H. erinaceus BP16 – источник полисахаридов с криозащитными свойствами. Для выявления криозащитных свойств ПФНЕ проводили замораживание лейкоцитов венозной крови человека в среде, содержащей глицерин (3,5%) и глицерин с ПФНЕ (0,25%). Через 1 сут хранения образцы отогревали в водяной ванне (+38 С). После отогрева в образцах оценивали: общее количество лейкоцитов в камере Горяева; степень криоустойчивости различных популяций клеток в мазках, окрашенных по Май-Грюнвальду и Романовскому; целостность клеточной мембраны лейкоцитов в пробах с 1,0% раствором эозина; долю (%) фагоцитирующих нейтрофилов с использованием инертных частиц латекса. Установлено влияние добавления ПФНЕ в водные растворы криопротекторов на процессы замерзания воды в венозной крови человека при ее криоконсервировании. Установлено, что присутствие ПФНЕ в составе консерванта, содержащего глицерин, обеспечивает сохранность ядросодержащих клеток крови человека в условиях отрицательных температур 20 °С и 80 °С, что

свидетельствует о его криозащитной активности [3]. Возможно роль ПФНЕ не ограничивается только криопротективным действием, поскольку в ее составе преобладают моносахаридные остатки галактозы и глюкозы. Глюкоза, как главный энергетический субстрат для роста клеток, может поддерживать их жизнеспособность в этом качестве и при холодовом стрессе. Кроме того, способность ПФНЕ снижать температуру замерзания глицерина, даже на десятые доли градуса, может способствовать снижению риска повреждений клеток при замораживании. Известно, что смещение температуры кристаллизации воды в клетках в диапазон более низких температур на начальных этапах охлаждения, способствует постепенному «вымораживанию» воды с образованием мелкоячеистой и потому менее травматичной структуры льда. Данная способность ПФНЕ может найти применение при разработке новых составов для замораживания биообъектов.

В связи с поиском новых эффективных компонентов для консервирующих растворов изучали влияние ПФНЕ в разных концентрациях (0,12; 0,36 и 0,60%) на показатели жизнеспособности сперматозоидов (интенсивность процессов перекисного окисления липидов, антиоксидантная активность, способность гамет к прогрессивному движению, устойчивость сперматозоидов к гипоосмотическому стрессу) быков голштинской породы в условиях гипотермического (+4оС) хранения [7]. Полученные в работе данные свидетельствуют о перспективности применения ПФНЕ в качестве антиоксидантного регулятора функциональной полноценности гамет при охлаждении и компонента для замедления скорости кристаллизации льда в клеточных суспензиях при их

замораживании.

Таким образом, комплекс полученных результатов показал, что низкая токсичность, высокая биологическая совместимость и активность ПФНЕ имеют неоспоримые преимущества перед другими классами химических веществ.

Список литературы

1. Friedman M. Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds // J. Agric. Food Chem. 2015. Vol. 32. P. 7108–7123.

2. Wang X.Y., Zhang D.D., Yin J.Y., Nie S.P., Xie M.Y. Recent developments in *Hericium erinaceus* polysaccharides: extraction, purification, structural characteristics and biological activities //Critical

reviews in food science and nutrition. 2019. Vol. 59. №. sup1. P. S96-S115. doi.org/10.1080/10408398.2018.1521370

3. Shirokikh I.G., Polezhaeva T.V., Shirokikh A.A., Khudyakov A.N., Sergushkina M.I., Nazarova Ja.I. et al. Cryoprotective Properties of the Polysaccharide Fraction of the Mushroom *Hericium erinaceus* BP 16. Biology Bulletin. 2020. Vol. 47. P.1-6 doi.org/10.1134/S1062359020010124

4. Азямов М.А., Широких А.А. Изучение антитоксических и антиоксидантных свойств полисахаридов гриба *Hericium erinaceus* и диальдерона на модели оксидативного стресса, вызванного хлоркарбоном у белых мышей // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 3. С. 205–211. doi: 10.25750/1995-4301-2021-3-205-211

5. Азямов М.А., Широких А.А., Ашихмина Т.Я. Сравнение токсичности противоопухолевых веществ: полисахаридов гриба *Hericium erinaceus* BP 16, диальдерона и метотрексата // Теоретическая и прикладная экология. 2019. № 4. С. 142–149. doi: 10.25750/1995-4301-2019-4-142-149

6. Азямов М.А. Возможность частичной замены антибиотиков биологически активными веществами при лечении клинических маститов у коров // Теоретическая и прикладная экология. 2018. № 4. С. 127–134. doi: 10.25750/1995-4301-2018-4-127-134

7. Соломина О.Н., Сергушкина М.И., Широких А.А., Полежаева Т.В., Широких И.Г., Зайцева О.О., Худяков А.Н. *Hericium erinaceus* BP16 как источник полисахаридов, стабилизирующих функции сперматозоидов быков при гипотермическом хранении // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 3. С. 212–218. doi: 10.25750/1995-4301-2021-3-212-218

БИОПРЕПАРАТЫ С АНТИБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ: ПРОДУКТЫ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ С БАКТЕРИЯМИ

Цивилева О.М., Шатерников А.Н., Евсеева Н.В.
Саратовский научный центр РАН

Интенсивность физиологических и биохимических процессов при росте и развитии грибного организма во многом определяются биотическими факторами внешней среды. Это обусловливает необходимость изучения совместного культивирования с бактериями для выявления роли этих факторов в жизнедеятельности грибных культур. Такого рода исследования полезны для целенаправленного отбора эффективных индукторов, повышающих стресс-устойчивость

съедобных культивируемых грибов. В рамках комплексной цели развития методологии культивирования ксилотрофных базидиомицетов путем повышения устойчивости грибов к негативным воздействиям окружающей среды за счет выращивания совместно со стимулирующими рост бактериями важный аспект – анализ антимикробной активности метаболитов - продуктов совместного культивирования. Полномасштабному практическому использованию лекарственных макробазидиомицетов как источника веществ с антибактериальными свойствами [1] зачастую препятствует низкое содержание искомых субстанций. Актуальным является поиск индукторов повышения уровня антимикробных агентов в культурах высших грибов.

Проведена физиолого-биохимическая характеризация двойных культур ксилотрофных базидиомицетов *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* с бактериями. Изучены параметры, характеризующие видовые и штаммовые особенности физиологии роста макромицетов на питательных средах с бактериальными микросимбионтами родов *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, в отношении погруженных культур. Контрольные эксперименты проводили с грибными монокультурами.

Определено влияние бактерий на ростовые характеристики грибов в зависимости от условий совместного глубинного культивирования. Выявлено увеличение биомассы грибного мицелия до 160% при культивировании с представителями родов *Bradyrhizobium*, *Stenotrophomonas*, с *Pseudomonas putida*, отсутствие снижения биомассы всех базидиомицетов в условиях двойных культур с *Pseudomonas fluorescens*. Выявлены свойства бактерий, способствующие повышению адаптационного потенциала грибных культур. Охарактеризован биохимический отклик ксилотрофных базидиомицетов на воздействие бактерий в двойной культуре: количественно оценена (ГХ-МС, ВЭЖХ, ГЖХ) продукция вне- и внутриклеточных соединений в двойных бактериально-грибных культурах. Проведен хроматографический анализ метаболитов ксилотрофных базидиомицетов в системах с бактериями *Bradyrhizobium japonicum*, *Stenotrophomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida*.

Выявленный вклад бактериального ассоцианта заключался не только в стимулировании роста базидиомицетов, но и усилении защитных свойств мицелия путем изменения редокс-статуса, усиленной биопродукции метаболитов как фенольной природы с

антиоксидантными (фенольные кислоты) и ауторегуляторными (тирозол) свойствами, так и индольной природы со свойствами ауторегулятора, выявленного у низших грибов (триптофол), фитогормональными (ИУК и ее предшественники), а также биопродукции метаболитов с антибактериальными и антифунгальными свойствами (индол, 2-индолинон, производное изокумарина, производное 3-гидрокси-4-пиранона, производное 1,2-циклопентандиона). При количественной оценке содержания соединения в анализируемом методом ВЭЖХ биопрепарате уровень компонента выражали в относительных единицах (отн. ед.) как площадь хроматографического пика, отнесенную к суммарной площади пиков.

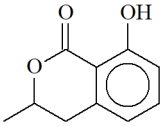
Индол продуцировался только в бинарных бактериально-грибных культурах с изученными штаммами бактерий *Bradyrhizobium japonicum* (*Flammulina velutipes+Bradyrhizobium japonicum*, *Pleurotus ostreatus+Bradyrhizobium japonicum*), *Pseudomonas putida* (*Flammulina velutipes+Pseudomonas putida*), а также на относительно высоком уровне, около 4 отн. ед., в смешанной культуре *Ganoderma lucidum+Pseudomonas fluorescens*. Относительная концентрация 2-индолинона, превышающая 0,1 отн. ед., в монокультуре выявлена только у базидиомицета *Lentinula edodes*, а превышающая 1 отн. ед. – только в бинарных культурах базидиомицетов *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus*. причем на уровне 4 отн. ед. – у *Lentinula edodes+Pseudomonas fluorescens*.

Получены данные о влиянии бактериального ассоцианта на продукцию необычных метаболитов. Методом ГХ-МС в мицелиальной культуре *Ganoderma lucidum* в присутствии бактерий родов *Bradyrhizobium* и *Pseudomonas* выявлена продукция соединения кумариновой природы (3,4-дигидро-8-гидрокси-3-метилизокумарин) (рисунок 1).

Количественные данные представлены в Таблице 1.

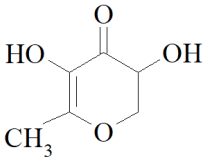
Рис. 1. 3,4-дигидро-8-гидрокси-3-метилизокумарин (время выхода 21.89 мин; C10H10O3, 178 г/моль).

Таблица 1. Площадь хроматографических (ГХ-МС) пиков (S·10–6).

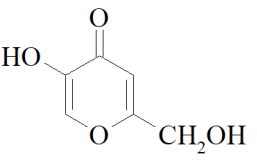
Соединение	*G. lucidum* монокультура	*G. lucidum*+ + *B. japonicum* 634b	*G. lucidum*+ + *B. japonicum* M8	*G. lucidum*+ + *P. fluorescens* El-2.1	*G. lucidum*+ + *P. putida* D4
	0 (не обнаружено)	2,714	4,250	6,782	5,222

Кумарины - структурно разнообразный класс 2Н-хромен-2-онов, соединений, рассматриваемых также как представители бензопироновой группы вторичных метаболитов. В настоящее время известно около полутора тысяч кумариновых соединений, идентифицированных в растениях, бактериях и грибах-эндофитах. Получено много доказательств широкого спектра биологического действия кумаринов природного и синтетического происхождения как основы малотоксичных и высокоэффективных лекарственных препаратов. Эти химические объекты обладают антибактериальной, в том числе противотуберкулезной, активностью, антифунгальным, антивирусным эффектами [2].

Через 14 сут культивирования в составе культуральной жидкости в ряде случаев обнаруживалось соединение 3,5-дигидрокси-6-метил-2,3-дигидро-4Н-пиран-4-он - структурный аналог койевой кислоты. Нельзя не отметить определенное сходство структуры обнаруженного дигидропиранона и 5-гидрокси-2-гидроксиметил-4Н-пиран-4-она, называемого также койевой кислотой (рисунок 2).



3,5-Дигидрокси-6-метил-2,3-дигидро-4*Н*-пиран-4-он



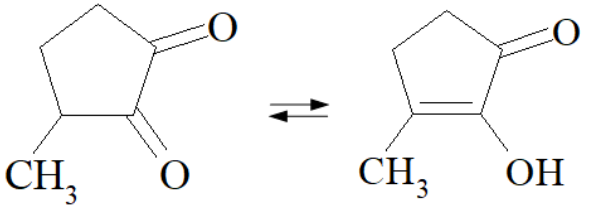
5-Гидрокси-2-гидроксиметил-4*Н*-пиран-4-он (койевая кислота)

Рис. 2. Структурные формулы 4Н-пиран-4-онов.

Молекула койевой кислоты, ценного природного продукта, содержит 3-гидрокси-4-пирановый скаффолд. Разноплановый терапевтический потенциал 3-гидрокси-4-пиранонов и родственных

соединений, в том числе аналогов койевой кислоты, не вызывает сомнений [3]. Этот полифункциональный гетероцикл - перспективный интермедиат для дизайна и синтеза соединений, производных койевой кислоты с выраженной антибактериальной, противогрибковой, другими видами биоактивности [4].

Корилон - пятичленное карбоциклическое соединение, отдаленный структурный аналог аскорбиновой кислоты [5], существующий в виде смеси дионового и енолонового таутомеров (рисунок 3).



3-Метил-1,2-циклопентандион 2-Гидрокси-3-метил-2-циклопентен-1-он

Рис. 3. Структурные формулы дионового и енолонового таутомеров корилона

Корилон не обнаружен нами в вариантах опытов с монокультурами. Представляется, что корилон выполняет двоякую роль в зависимости от про/антиоксидантного статуса грибной культуры. Этому способствует двойственная природа корилона, который с одной стороны является структурным (топологическим) аналогом аскорбиновой кислоты, известного антиоксиданта, а с другой - дикарбонильным соединением, прооксидантом, медиатором пероксидного окисления липидов [6, 7]. В исследовании свободнорадикального повреждения биомолекул значительная роль отводится процессам образования и распада -гидроксилсодержащих углеродцентрированных радикалов (-ГУР) [8]. Циклические пятичленные кетоны и лактоны способны окислять -ГУР. Показано, что карбонильная группа пятичленных карбоциклических кетонов (к числу которых принадлежит и корилон) - ключевой элемент, ответственный за реакционную способность по отношению к -ГУР [5]. При этом наблюдается симбатная корреляция между количеством карбонильных групп в молекуле кетона и его окислительными свойствами в отношении -ГУР [9]. Поэтому образование альдегидных продуктов окисления -ГУР более эффективно под действием дикетона корилона по сравнению, например, с гомологами циклопентан-1-она. Дальнейшие превращения продуктов одноэлектронного

восстановления карбонилсодержащих производных циклопентана зависят от их строения.

Антибактериальную активность продуктов из мицелиальной биомассы и внеклеточных метаболитов моно- и бинарных погруженных культур изучали в отношении бактериальных фитопатогенов *Micrococcus luteus*, *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pseudomonas fluorescens* и *Xanthomonas campestris*. Данные штаммы бактерий являются возбудителями многих заболеваний культурных растений [10-12]. Антифунгальную активность проверяли на тест-системах *Fusarium oxysporum* IBPPM 543 и *Phytophthora cactorum* VKM F-985. Среди разнообразных мицелиальных патогенных грибов аскомицеты и оомицеты из родов *Fusarium* и *Phytophthora* соответственно являются одними из самых разрушительных известных патогенов растений, поражают широкий круг хозяев и способны вызывать гибель целых зараженных растений [13]. Обнаружена высокая активность продуктов из внеклеточных метаболитов бинарных погруженных культур против фитопатогенов бактериального (*M. luteus*, *P. carotovorum subsp. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *Ps. fluorescens* и *X. campestris*) и грибкового (*F. oxysporum* и *P. cactorum*) происхождения, сравнимая с широко применяемыми препаратами и коррелирующая с присутствием в изучаемых продуктах обсуждаемых выше низкомолекулярных соединений с антимикробной активностью.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 22-24-00415).

Список литературы

1. Nephali L., Piater L.A., Dubery I.A., Patterson V., Huyser J., Burgess K., Tugizimana F. // Metabolites. 2020. Vol. 10, No. 12. Article 505.

2. Tsivileva O.M., Koftin O.V., Evseeva N.V. // Antibiotics. 2022. Vol. 11, No. 9. Article 1156.

3. Emami S., Ahmadi R., Ahadi H., Ashooriha M. // Medicinal Chemistry Research. 2022. Vol. 31, No. 11. P. 1842-1861.

4. Saeedi M., Eslamifar M., Khezri K. // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019. Vol. 110. P. 582-593.

5. Бринкевич С.Д., Шадыро О.И. // Химия высоких энергий. 2008. Т. 42, № 4. С. 297-302.

6. Saito F., Iwamoto S., Yamauchi R. // Food Chemistry. 2011. Vol. 124, No. 4. P. 1496-1499.

7. Atrooz O.M. // International Journal of Food Science & Technology.

2008. Vol. 43, No. 3. P. 490-494.

8. Lagutin P.Yu., Shadyro O.I. // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2005. Vol. 15, No. 16. P. 3797-3800.

9. Brinkevich S.D., Reztsov I.A., Shadyro O.I. // High Energy Chemistry. 2014. Vol. 48. P. 303-309.

10. Ragasova L., Penazova E., Gazdik F., Pecenka J., Cechova J., Pokluda R., Baranek M., Grzebelus D., Eichmeier A. // Agronomy. 2020. Vol. 10. Article 443.

11. Abd-El-Khair H., Abdel-Gaied T.G., Mikhail M.S., Abdel-Alim A.I., El-Nasr H.I.S. // Bulletin of the National Research Centre. 2021. Vol. 45. Article 37.

12. Huang X., Ren J., Li P., Feng S., Dong P., Ren M. // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2021. Vol. 101. P. 1744-1757.

13. Wang T., Gao C., Cheng Y., Li Z., Chen J., Guo L., Xu J. // Plants. 2020. Vol. 9. Article 769.

Глава 14

ГРИБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ И НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.14

БИОПРЕПАРАТЫ С АНТИБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ: ПРОДУКТЫ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ С БАКТЕРИЯМИ

Абдулахадова Г.Ш.
Институт микробиология АН РУз, Ташкент, Узбекистан

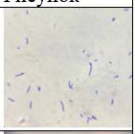
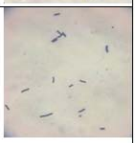
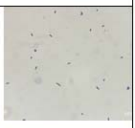
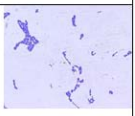
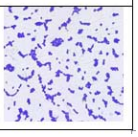
Объектами для выделения служили молочнокислые бактерии изолированые с помощью методов классической микробиологии из мазков женщин репродуктивного возраста. Образцы измельчали, затем помещали в МРС бульон и культивировали при 37оС 48 часов для обогащения.

Из обогащенного бульона готовили серийные разведения и засевали сплошным газоном на МРС агар по 2 чашки на каждое разведение. 1 чашку из 2 повторности помещали в термостат в аэробных условиях культивирования, вторую – в анаэростат, где воздух заменяли газообразным азотом (в анаэробных условиях). Культивировали чашки при 37оС 48 часов. Культивирование лактобацилл проводили на селективной питательной среде для лактобацилл МРС (Hi-media, Индия при 37-400 С в аэробных и анаэробных условиях в течение 24-48 часов. Для создания анаэробных условий использовали анаэростат (Schnett-biotech GmbH, Германия). Идентификация выделенных штаммов проводилась по морфолого культуральным и физиолого-биохимическим свойствам по показателям, указанным в «Определителе Берджи» [1], масспектрофотометра MALDI-TOF. В работе использовали стандартные методические указания и общепринятые методы микробиологического анализа [1, 2, 3].

В результате исследований первоначально отобраны 20 штаммов. Для дальнейшей работы были выбраны 5 штаммов, которые согласно определителю «Берджи» и MALDI-TOF были отнесены к следующим видам *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus brevis* G2, *Lactobacillus plantarum* G1, *Lactobacillus plantarum* G2, *Pediococcus acidilactici*. У выделенных культур исследовали морфолого культуральные особенности (внешний вид колоний, размер, цвет) и на физиолого биохимические свойства (каталазная, желатиназная, амилазная активность, сбраживание углеводов) таблица 1.

Известно, что для использования в производстве молочнокислые бактерии имеют определенные свойства. Штаммы молочнокислых бактерий не должны продуцировать ферменты, относящиеся к факторам патогенности например каталазу и др.

Таблица 1. Морфология молочнокислых культур.

Культуры	Описание колоний	Описание клеток	Рисунок
Lactobacillus plantarum G1	Бело-бежевые колонии с ровным краем, размер 1-2 мм, поверхность гладкая, блестящая	Короткие палочки в коротких цепочках иногда одиночные клетки размером 0,6-0,9x2,0-4,0 мкм	
Lactobacillus plantarum G2	Бело-бежевые колонии с ровным краем, размер 1-2,5 мм, поверхность гладкая, блестящая	Короткие палочки в цепочках иногда одиночные клетки размером 0,6-0,8x2,0-3,5 мкм	
Lactobacillus brevis G1	Круглые каплевидные бежевые колонии с ровным краем, размер 1-2,5 мм, поверхность гладкая, блестящие	Короткие палочки в коротких цепочках размером 0,3-0,6x1,0-2,0 мкм	
Lactobacillus brevis G2	Круглые каплевидные бежевые колонии с ровным краем, размер 1-2 мм, поверхность гладкая, блестящие	Короткие палочки в коротких цепочках размером 0,4-0,6x1,0-2,0 мкм	
Pediococcus acidilactici	Круглые выпуклый белые колонии с ровным краем, размер 0,2 мм, поверхность глянцевая, блестящие	Сферическую форму с приблизительными размерами 1 x 2,5 мкм	

Известно, что для использования в производстве молочнокислые бактерии имеют определенные свойства. Штаммы молочнокислых бактерий не должны продуцировать ферменты, относящиеся к факторам патогенности например каталазу и др. Проведенный качественный тест на каталазную активность показал, что отобранные молочнокислые бактерии не обладали каталазной активностью. Также культуры *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus brevis* G2, *Lactobacillus plantarum* G1, *Lactobacillus plantarum* G2, *Pediococcus acidilactici* не разжижали желатин и не проявили амилазную активность. Ферментированые углеводов являются важнейшими характеристиками при установлении видовой принадлежности культур. Все молочнокислые бактерии используют углеводы в качестве энергии с последующим образованием молочной кислоты. Было изучено отношение указанных культур к 10 источникам углевода. Наблюдения за изменением кислотности (понижением pH питательной среды), т.е. положительной реакцией, по изменению цвета за счет осветления индикатора в кислой среде,

вели ежедневно в течение 7 суток. Результаты по ферментации углеводов лактобактериями *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus brevis* G2, *Lactobacillus plantarum* G1, *Lactobacillus plantarum* G2, *Pediococcus acidilactici* приведены . Как показывают результаты, культура *Lactobacillus plantarum* G1 интенсивно сбраживала L-арабинозу, целлобиозу, галактозу, сахарозу и рамнозу уже в первые 24-48 часов культивирования при 37°С. Культура не сбраживала лактозу, мальтозу, раффинозу и манитол.

В таких же условиях *Lactobacillus plantarum* G2, *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus brevis* G2, *Lactobacillus paracasei* интенсивно ферментировали галактозу, лактозу, мальтозу, а также арабинозу, сахарозу, целлобиозу, мелибиозу. За исключением мелибиозу и манитол культура *Pediococcus acidilactici* не сбраживала. *Lactobacillus plantarum* G1 не сбраживал лактозу, мальтозу, манитол. Все исследуемые культуры не сбраживали углевод рафинозу.

В таких же условиях *Lactobacillus plantarum* G2, *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus brevis* G2, *Pediococcus acidilactici* интенсивно ферментировали галактозу, лактозу, мальтозу, а также арабинозу, сахарозу, целлобиозу, мелибиозу. За исключением мелибиозу и манитол культура *Pediococcus acidilactici* не сбраживала. *Lactobacillus plantarum* G1 не сбраживал лактозу, мальтозу, манитол. Все исследуемые культуры не сбраживали углевод рафинозу.

В результате проведенных исследований из природных источников и молочных продуктов выделены молочнокислые бактерии изучены морфолого-культуральные свойства и установлено их систематическое положение. Отмечено, что культуры *Lactobacillus plantarum* G1, *Lactobacillus plantarum* G2, *Lactobacillus brevis* G1, *Lactobacillus brevis* G2, Pediococus *acidilactici* не разжижали желатин и не проявляли каталазную и амилазную активность. Интенсивно ферментировали галактозу, лактозу, мальтозу, а также арабинозу, сахарозу, целлобиозу и мелибиозу.

Список литературы

1. МУ ВНИИМС 01.86.02.-89 Методические указания по селекции молочнокислых бактерий в состав заквасок и препаратов для мелких сычужных сыров. – Углич: ВНИИМС, 1989. – 87 с.

2. МР 2.3.2.2327-08 Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов). – Углич: ГНУ ВНИИМС, 2008. – 243 с.

3. ОФС.1.7.2.0012.15 Производственные пробиотические штаммы

и штаммы для контроля пробиотиков. 2015г.

МЕЛАНИН И ПУЛЛУЛАН СИНТЕЗИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЭПИФИТА *AUREOBASIDIUM PULLULANS* L1, АССОЦИИРОВАННОГО С БАРБАРИСОМ ОБЫКНОВЕННЫМ (*BERBERIS VULGARIS*)

Буриева М.Р., Абдульмянова Л.И., Гулямова Т.Г.
Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

В последнее время при оптимизации биопроцессов для аксенической культуры микроорганизма – продуцента начали широко применять стратегию OSMAC.

Термин OSMAC - «один штамм много соединений» ввели Bode H.B. с соавт. для описания возможности синтеза одним микробным штаммом множества различных соединений при изменении параметров культивирования.

Стратегия OSMAC способствовала открытию новых, ранее неизученных метаболитов, подчеркивая решающую роль оптимизации параметров культивирования в микробной ферментации для получения желаемых результатов [1].

Существует множество примеров, показывающее чувствительность метаболических путей микроорганизмов к малейшим, даже незначительным изменениям условий культивирования.

Так, Paranagama с соавт. сообщили о продукции шести новых вторичных метаболитов *Paraphaeosphaeria quadriseptata* при использовании дистиллированной воды в среде вместо водопроводной воды. Аналогично, когда среда была изменена с твердой на жидкую, *Chaetomium chiversii* производил радицикол вместо кетохромина А [2].

Оптимизировать питательную среду и параметры культивирования, можно либо изменив один параметр, либо несколько одновременно [3].

«Черные дрожжи» - группа микроорганизмов, способная к синтезу меланина, пигмента, успешно исследуемого в медицине, фармацевтической и сельскохозяйственной промышленности, благодаря своим радио- и фотопротекторным, антиоксидантным, противовоспалительным и другим свойствам [4,5].

Нами при исследовании микробного разнообразия Зааминского заповедника, расположенного на высоте более 2000 метров над уровнем моря на северном склоне западной части Туркестанского хребта Памиро-Алая (Джизакская область, Узбекистан) и характеризующегося уникальными природными условиями, из цветков *Berberis vulgaris*

(барбарис обыкновенный) был выделен в чистую аксеническую культуру и идентифицирован штамм «черных дрожжей» - *Aureobasidium pullulans* L1, способный синтезировать пигмент меланин и полисахарид пуллулан [6, 7].

Выделенный штамм обладал полиморфизмом: молодая культура при росте на агаризованных средах образовывала дрожжеподобные блестящие, слизистые, точечные колонии с ровным краем темно бурого почти черного цвета вязкой консистенции с последующим появлением воздушного мицелия. При этом наряду с почкующимися дрожжевыми клетками наблюдались септированные гифы. При росте на жидкой среде штамм накапливал биомассу черного цвета (Рис.1).

Методом щелочной экстракции из биомассы культуры был выделен пигмент, по физико-химическим и спектрофотометрическим свойствам отнесенный к меланинам.

Спиртовой экстракцией из культуральной жидкости - выделен полисахарид, отнесенный к пуллулану, обладающий вязкостью и способностью к набуханию, что определяет его применение в парфюмерной, пищевой промышленности и фармацевтике.

С целью оптимизации среды культивирования и изучения возможности получения высокого выхода обоих продуктов была исследована способность выделенного штамма *Aureobasidium pullulans* L1 синтезировать меланин и пуллулан на средах, содержащих в качестве источников углерода – глюкозу и сахарозу, в качестве источников азота – пептон и дрожжевой экстракт.

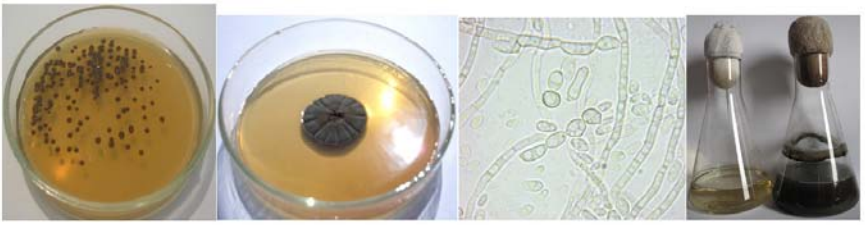


Рис. 1. Рост *Aureobasidium pullulans* L1 на агаризованной и жидкой среде.

Материалы и методы исследований

Выделение эпифитных культур «черных дрожжей» проводили по методике B. Bhadra et al [8].

Исследование морфолого-культуральных свойств проводили согласно «Методам выделения и идентификации дрожжей» И.П. Бабьевой [9].

Для накопления биомассы штамм *Aureobasidium pullulans* L1

культивировали на 7-баллинговом сусле в течении 10 суток, на качалке при температуре 280С с добавлением различных источников углерода и азота.

Для определения сухого веса биомассу высушивали до постоянного веса при температуре 1050С.

Выделение пигмента темно-бурого цвета проводили методом щелочной экстракции из биомассы с последующим кислотным осаждением. Для этого микробную биомассу центрифугировали при 6 000 об/мин в течении 20 минут, промывали в дистиллированной воде, ресуспензировали в 0,5Н NaOH и подвергали автоклавированию при 1атм. 15 минут. Образец после автоклавирования центрифугировали, отбирая супернатант, который подкисляли концентрированной HCl до выпадения хлопьевидного осадка темно-бурого цвета. Полученный осадок собирали центрифугированием, промывали в дистиллированной воде и ацетоне.

Выделение полисахарида проводили методом спиртовой экстракции из культуральной жидкости охлажденным 96% этанолом в соотношении 1:1 с последующим центрифугированием при 6000 об/мин в течении 20 минут и вторичной экстракцией в соотношении 1:2 (к/ж: С2Н5ОН).

Результаты и обсуждение

Результаты исследований по культивированию штамма *Aureobasidium pullulans* L1 на средах с различными источниками углерода и азота для получения меланина из биомассы и пуллулана из культуральной жидкости представлены на рисунках 2 и 3.

Из представленных на рисунке 2 данных видно различное влияние источников углерода и азота как на накопление биомассы *Aureobasidium pullulans* L1, так и на выход меланина.

Так, внесение в качестве источников углерода – глюкозы приводит к увеличению выхода биомассы в 1,5-2 раза по сравнению с выходом при внесении сахарозы.

Внесение дрожжевого экстракта в качестве источника азота стимулирует выработку меланина почти в 3 раза выше, чем внесение пептона.

Наименьшее накопление биомассы и пигмента наблюдалось при сочетании сахароза - пептон. Наиболее благоприятное сочетание, при котором выход пигмента увеличился до 40% на 1г сухого веса составляло глюкозу - дрожжевой экстракт.

Внесение дрожжевого экстракта также положительно влияло и на продукцию полисахарида культурой *Aureobasidium pullulans* L1, составившее 47-54% на 100мл культуральной жидкости (Рис.3).

При этом отмечена особенность штамма более эффективно утилизировать глюкозу, хотя Jinlong Ma с сотр. сообщают о сахарозе как оптимальном источнике углерода для биосинтеза пуллулана [10].

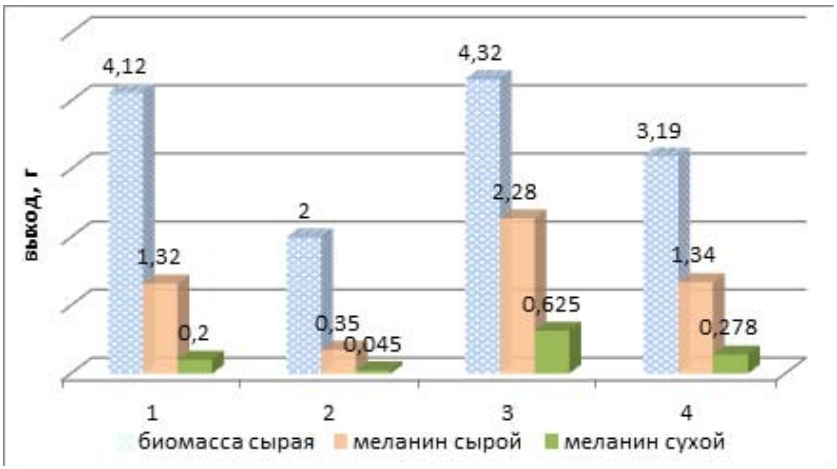


Рис. 2. Выход биомассы, сырого и сухого меланина *Aureobasidium pullulans* L1 на средах, содержащих: 1 – глюкоза и пептон, 2 – сахароза и пептон, 3 – глюкоза и дрожжевой экстракт, 4 – сахароза и дрожжевой экстракт.

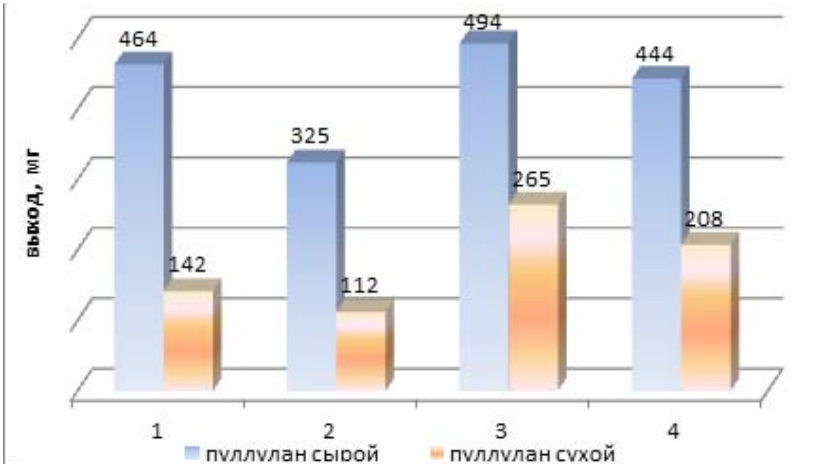


Рис. 3. Выход полисахарида *Aureobasidium pullulans* L1 на средах, содержащих: 1 – глюкоза и пептон, 2 – сахароза и пептон, 3 – глюкоза и дрожжевой экстракт, 4 – сахароза и дрожжевой экстракт.

В целом, выявлена прямая зависимость продукции внутриклеточных (пигмент меланин) и внеклеточных (полисахарид пуллулан) метаболитов от накопления биомассы штамма *Aureobasidium pullulans* L1.

Таким образом, оптимизация среды культивирования показала эффективность использования в качестве источника углерода – глюкозу и в качестве источника азота – дрожжевой экстракт как наиболее оптимальные для получения высокого выхода, как меланина, так и пуллулана эпифитом *Aureobasidium pullulans* L1.

Список литературы

1. Bode Helge Bj rn, Bethe Barbara, H fs Regina, Zeeck Axel. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. // Chembiochem, 2002. - 2; 3, (7):619-27.

2. Paranagama Priyani A., Wijeratne E. M. Kithsiri, Gunatilaka A. A. Leslie. Uncovering Biosynthetic Potential of Plant-Associated Fungi: Effect of Culture Conditions on Metabolite Production by *Paraphaeosphaeria quadriseptata* and *Chaetomium chiversii*. // J. Nat. Prod., 2007. - 70, 12, 1939–1945.

3. Thiry Michel, Cingolani Doriano. Optimizing scale-up fermentation processes. // Trends Biotechnol, 2002. – 20 (3):103-5.

4. Plonka P.M., Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms -biotechnological and medical aspects. // Acta biochimica Polonica, 2006, Vol.53, No.3, p.429-443.

5. Sandra R. Pombeiro-Sponchiado, Gabriela S. Sousa, Jazmina C.R. Andrade. Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications. http://dx.doi.org/10.5772/67375.

6. Соколова В.Е., Сыроечковский Е.Е. Заповедники Средней Азии и Казахстана / Москва, «Мысль», 1990. – 399 с.

7. Mingalieva L.I., Gulyamova T.G. Melanin-synthesizing ability of isolate from plant organs of Zaamin preserve. // Chemistry of natural compounds, 2009 - Vol.45, No 3, p.459.

8. Bhadra, Bhaskar, Sreenivas Rao, R., Singh, Pavan K., Sarkar, Partha K., Shivaji, Sisinthy. Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. // Current Microbiology, 2008, 56 (5). pp. 489-494.

9. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей, Изд-во «Пищевая промышленность», М., 1979, С.120.

10. Jinlong Ma, Guobin Jiang, Shanjing Yao, Hua Jin, Changhai Wang. Studies on the optimal culture conditions of *Aureobasidium pullulans* to produce exopolysaccharides. // J. Biomedical Science and Engineering, 2012, 5, 203-207.

ОБРАЗОВАНИЕ БИОАКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ СИБИРСКИМИ ШТАММАМИ *CORDYCEPS MILITARIS* (L.) FR.

Антипова Т.В.[1], Желифонова В.П. [1], Баскунов Б.П.[1], Литовка Ю.А.[2,3], Павлов И.Н.[2,3], Долгачева Ю.А.[4], Чистяков И.Н.[4]

[1]Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрябина ФИЦ ПНЦ БИ РАН, Пущино

[2]Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН, Красноярск

[3]Сибирский государственный университет науки и технологий им/ М.Ф. Решетнева, Красноярск

[4]ООО "Центр доклинических и клинических исследований", Пущино

Поиск новых продуцентов известных биологически активных веществ (БАВ) является одной из задач биотехнологии. В последнее время внимание исследователей обращено на энтомопатогенные грибы рода *Cordyceps Fr.* [1]. Эти грибы известны как одни из древних лекарственных средств Тибета и Китая и их давно используют в лечебных целях в странах Юго-Восточной Азии из-за их биологической и фармакологической активности. Эти грибы содержат важные биоактивные ингредиенты, такие как экзополисахариды, аденозин, кордицепин (3'-дезоксиаденозин) и др. [1, 2] Полисахариды оказывают противовоспалительные, антиоксидантные, противоопухолевые, антиметастатические, иммуномодулирующие, гипогликемические, стероидогенные и гиполипидемические эффекты. Аденозин заслуживает внимание как возможное кардиопротекторное и терапевтическое средство при хронической сердечной недостаточности. Кордицепин является аналогом нуклеозида, проявляющим антибактериальную, противогрибковую, противоопухолевую и противовирусную активность.

В настоящее время практическое значение приобретает биотехнологическое получение БАВ из мицелия гриба вида *C. militaris* (L.) Fr. [3, 4]. В чистую культуру гриб изолируют из плодовых тел, сформировавшихся на куколках и личинках насекомых, относящихся к различным семействам чешуекрылых: хохлатки, совки, пяденицы и совковидки. На территории России он встречается достаточно часто: в первую очередь, в Приморском крае, реже — в центре и на юге европейской части страны. Сведения о встречаемости и биологии *C. militaris* на территории Сибири до недавнего времени практически отсутствовали, за исключением нескольких свидетельств о находках этого гриба в Иркутской и Новосибирской областях [5, 6].

Целью работы было идентифицировать и изучить влияние условий

культивирования на образование БАВ тремя сибирскими штаммами *C. militaris*. Штаммы *C. militaris* 11-3, 11-4, 11-5 были выделены из погибших гусениц сибирского шелкопряда (*Dendrolimus sibiricus Tschetverikov*), обнаруженных в подстилке и кроне *Abies sibirica Ledeb.* на территории Енисейского лесничества Красноярского края в 2017 г. Штаммы хранятся в коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия). Видовая идентификация была подтверждена молекулярно-генетическими методами. Было проведено секвенирование участков генетических маркеров ITS (internal transcribed spacer) и TEF-1alpha (transcription elongation factor 1-alpha) с использованием оборудования ЦКП «Инновационные технологии защиты растений» Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (Санкт-Петербург-Пушкин).

Было показано, что оптимальная температура роста сибирских штаммов составила 25 С. Штаммы различались по скорости роста. Наибольшую скорость роста имел штамм *C. militaris* 11-5 (2.5 мм/сут), у штаммов 11-4 и 11-3 она была меньше на 12 и 30% соответственно.

Было изучено влияние на рост и биосинтез БАВ двух источников углерода (глюкоза или сахароза) в присутствии триптона при глубинном и поверхностном культивировании штаммов. Количественное содержание полисахаридов определяли в мицелии и в фильтрате культуральной жидкости методом УФ-спектроскопии с использованием 5% фенола и H2SO4 (конц.) [2]. Методами ТСХ и масс-спектрометрии у сибирских штаммов *C. militaris* в культуральной жидкости и в мицелии были идентифицированы полисахариды и аденозин, а кордицепин обнаружен не был. Ранее в геноме *C. militaris* были идентифицированы четыре гена кордицепинсинтетазы (Cns1 - Cns4), участвующие в биосинтезе кордицепина [7]. Можно предположить, что гены биосинтеза кордицепина у сибирских штаммов экспрессируются на недостаточном уровне при культивировании в искусственных средах.

Показано, что накопление биомассы на сахарозе было выше на 10-15% по сравнению с глюкозой как при глубинном, так при поверхностном культивировании штаммов. Суммарное содержание полисахаридов у штаммов при глубинном культивировании было выше на 25-60% по сравнению с поверхностным и составило 4.2-6.0 г/л. Наиболее продуктивным оказался штамм *C. militaris* 11-5. Продукция полисахаридов у штаммов была на уровне или выше по сравнению с данными известными в литературе [2]. Содержание аденозина у штаммов было в пределах 100-200 мг/л и не зависело от способа культивирования. При использовании сахарозы продукция аденозина штаммами была в

1.3-1.4 раза выше по сравнению с глюкозой.

Было изучено влияние на рост и биосинтез БАВ четырех источников азота (триптон, гидролизат казеина, глутамат, NaNO3) в присутствии глюкозы при глубинном культивировании штамма *C. militaris* 11-5. Было показано, что источники азота оказали незначительное влияние на накопление биомассы, но повлияли на продукцию полисахаридов. При использовании грибом нитрата, глутамата и гидролизата казеина содержание полисахаридов было ниже в 7.6, 1.8 и 1.5 раза по сравнению с триптоном.

Таким образом, для дальнейшего изучения и практического использования был отобран штамм *C. militaris* 11-5. Были подобраны условия культивирования и состав среды для биосинтеза биоактивных соединений: глубинное культивирование при температуре 25 С в среде с глюкозой или сахарозой, триптоном или гидролизатом казеина.

Список литературы

1. Kontogiannatos D., Koutrotsios G., Xekalaki S., Zervakis G.I. Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*—a review of various aspects and recent trends towards the exploitation of a valuable fungus. J. Fungi. 2021, 7(11): 986.

2. Shih I.L., Tsai K.L., Hsieh Ch. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochem. Engin. J. 2007, 33: 193–201.

3. Cui J.D. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. Crit. Rev. Biotechnol. 2015, 35(4): 475–484.

4. J drejko K.J., Lazur J., Muszy ska B. *Cordyceps militaris*: an overview of its chemical constituents in relation to biological activity. Foods. 2021, 10(11): 2634.

5. Крюков В.Ю., Ярославцева О.Н. *Cordyceps militaris*: целебная "трава, поедающая гусеницу". Наука из первых рук. 2007, 4 (16).

6. Огарков Б.Н., Огарков О.Б., Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В. Грибы рода *Cordyceps* (Fr.) Link em. Kabayasi et Mains из экосистем Южного Байкала как продуценты высоких концентраций иммуномодулятора кордицепина. Серия «Биология. Экология» 2012, 5(2): 75–80.

7. Xia Y., Luo F., Shang Y., Chen P., Lu Y., Wang C. Fungal cordycepin biosynthesis Is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin. Cell Chem. Biol. 2017, 24 1479–1489.e4.

МИЦЕЛЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ СЕМЕЙСТВА *OPHIOCORDYCIPITACEAE* – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ЭКЗОФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Басалаева Д. Л.[1], Богомолова А. А.[2], Осмоловский А. А.[1]
[1]МГУ, Москва
[2]НИУ ВШЭ, Москва

Гидролитические экзоферменты грибов, такие как целлюлазы, амилазы и другие, широко используются в биотехнологии для различных целей. Один из наиболее распространенных способов использования гидролитических экзоферментов грибов - это производство ферментов, которые разлагают белки, углеводы и жиры в сырье, что позволяет получить продукты с улучшенными вкусовыми и текстурными свойствами. Гидролитические экзоферменты грибов также используются в производстве биодеградируемых пластиков. Грибы могут разлагать различные материалы, включая древесину, целлюлозу и другие биомассы, что делает их полезными для производства биопластиков [1 – 3].

В связи с этим актуальным является поиск и характеристика новых продуцентов гидролаз среди микромицетов.

Целью исследования являлось изучение потенциальной способности представителей мицеллиальных грибов из семейства *Ophiocordycipitaceae* продуцировать гидролитические экзоферменты, способные гидролизовать такие субстраты, как твин-80, крахмал, целлюлозу, пектин и танины.

Объектами исследования являлись представители семейства *Ophiocordycipitaceae* – штамм *Purpureocillium takamizusanense* и два штамма вида *Purpureocillium lilacinum*. Для определения гидролитических свойств была использована методика, заключающаяся в инокуляции грибов в плотную питательную среду с источником специфических субстратов. В качестве субстратов были использованы твин-80 для липаз, порошковая целлюлоза для целлюлаз, яблочный пектин для пектиназ, растворимый крахмал для амилаз и танины для выявления таназ. Посевы инкубировались при 28 °C в течение 4 суток.

Учет проводился при помощи визуализации зон гидролиза субстратов раствором Люголя в случае пектина, крахмала и целлюлозы и 1% раствора желатина для визуализации таназ. Визуализация зон гидролиза твин-80 проводилась по изменению цвета индикатора метилрота в кислую сторону. Результаты выражались в энзиматических индексах EI-отношение диаметра зоны гидролиза к диаметру колонии микромицета.

Все эксперименты проводили не менее чем в трех биологических и трех аналитических повторностях.

В результате проведенных экспериментов были получены данные энзиматических индексов штаммов грибов рода *Purpureocillum* (табл. 1).

Таблица 1. Энзиматические индексы исследуемых штаммов в отношении специфичных субстратов.

	Липазы	Пектиназы	Таназы	Амилазы	Целлюлазы
4207	2,03	1,00	1,00	1,21	1,00
4241	3,11	1,31	1,00	1,00	1,00
5376	2,00	1,26	1,00	1,00	3,40

В результате были получены данные о том, что 100% штаммов гидролизовали твин-80, 66,7% - яблочный пектин, 33,3% оказались способны к энзиматическому разложению растворимого крахмала и порошковой целлюлозы и ни один из исследуемых штаммов не проявил способности к синтезу таназ (рис. 1).

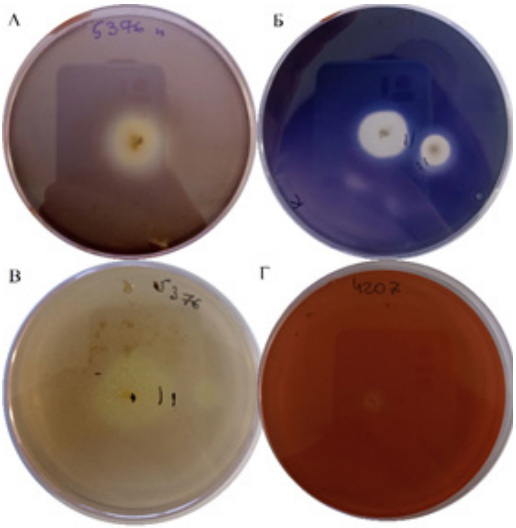


Рис. 1. продукция гидролитических экзоферментов исследуемыми штаммами:

А – гидролиз пектина *Purpureocillium lilacinum*; Б – зона гидролиза растворимого крахмала штаммом *Purpureocillium lilacinum*; В – целлюлолитическая активность штамма *Purpureocillium lilacinum*,

Г – липазы штамма *Purpureocillium lilacinum*

Пектиназы - это группа ферментов, которые расщепляют пектин, сложный углеводород, который обнаруживается в клеточных стенках растительных тканей. Использование пектиназ в биотехнологии может помочь в производстве фруктовых соков, вин и других продуктов, так как они улучшают прозрачность и текучесть жидкостей. Кроме того, использование пектиназ может помочь в биодеградации растительных отходов, что может уменьшить негативное воздействие на окружающую среду.

Список литературы

1. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential / J. L. Pereira [et al.] // Letters in applied microbiology. – 2007. – Т. 44. – №. 6. – С. 573-581.

2. Евлахова, А. А. Энтомопатогенные грибы. Систематика, биология, практическое значение / А. А. Евлахова. - Л.: Наука, 1974. 260с.

3. Ferreira J. M., de Freitas Soares F. E. Entomopathogenic fungi hydrolytic enzymes: a new approach to biocontrol? / J. *M. F*erreira, F. E. de Freitas Soares //Journal of Natural Pesticide Research. – 2023. – С. 1000- 1020.

МОДИФИКАЦИЯ СПОР МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ

Бокарева Д.А.[1], Мысякина И.С.[2], Ванцян М.А.[1]
[1]Курчатовский институт, Москва
[2]ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Грибы обладают широкими адаптивными возможностями, которые позволяют им приспосабливаться к изменчивым условиям окружающей среды. При наступлении неблагоприятных условий, в том числе неоптимальных по температуре, солености, кислотности, влажности, а также при исчерпании питательных веществ в ростовой среде, процесс спорообразования является наиболее эффективным ответом для преодоления стресса и выживания гриба [1, 2, 3]. Выход клеток из состояния покоя – прорастание спор – может регулироваться в лабораторных условиях при использовании ряда приемов. На скорость прорастания спор может повлиять модификация поверхности их клеточной стенки (КС) синтетическими полиэлектролитами (ПЭ). Для проверки гипотезы о том, что модификация поверхности спор может ускорить или замедлить скорость прорастания, был проведен ряд экспериментов.

В работе использовали: мукоровый гриб *Cunninghamella* japonica (синоним – *C. echinulata*) ВКМF-1204 (–) (отдел *Zygomycota*, подотдел

Mucoromycotina, порядок *Mucorales*, семейство *Cunninghamella*ceae) и анаморфный гриб аскомицетного аффинитета *Aspergillus sydowii* BKMF-441 (отдел *Ascomycota*, класс *Eurotiomycetes*, порядок *Eurotiales*, семейство *Aspergillaceae*).

Споровый материал для модификации получали следующим образом: спорами 7-суточной культуры грибов, выращенной в пробирках со скошенном сусло-агаре в течение 7 суток при температуре 25°С, засевали поверхность сусло-агара в стеклянных матрасах и выращивали в течение 12 суток в термостате при температуре 25°С. Споры смывали холодной водой (+4°С); полученный споровый материал отфильтровывали через капроновый фильтр, чтобы удалить обрывки мицелия и частицы агара. Далее споры осаждали с помощью центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 минут.

Для модификации отбирали ~0,01 г замороженного материала спор и разводили его в ~1 мл деионизованной воды для достижения концентрации С ~ 20 г/л. Из полученной суспензии спор отбирали по 0,3 мл и добавляли их к 1 мл раствора полиэлектролита. Полученный раствор перемешивали на шейкере при 1000 об./мин в течение 15 минут. Модифицированные споры осаждали центрифугированием в центрифуге (“Sigma”) в течение 2 минут при 2000 об./мин, надосадочную жидкость отбрасывали. Затем добавляли деионизованную воду и повторяли центрифугирование. Данную процедуру повторяли трижды. Часть модифицированных спор отбирали для измерения дзета-потенциала, другую для оценки прорастания.

В качестве полианиона использовали синтетический полиэлектролит (ПЭ) полистиролсульфонат натрия (PSS) в концентрации 0,1, 0,5 и 1%, а в качестве поликатиона синтетический полиэлектролит – полиаллиламин гидрохлорид (PAH) в концентрации 0,1, 0,5 и 1%.

Прорастание спор проводили на стеклах, покрытых тонким слоем сусло-агара (0,5 мл), которые помещали в стерильные чашки Петри. На стекло с сусло-агаром наносили 0,1 мл суспензии модифицированных спор. Чашки со стеклами помещали в термостат при температуре 25°С.

Для модификации были выбраны споры двух мицелиальных грибов с разной скоростью прорастания. Споры *Cunninghamella* japonica прорастают в течение 3 6 часов с момента засева, тогда как споры *Aspergillus sydowii* в течение 12 14 часов. После модификации был произведен замер дзета-потенциала, как исходных спор, так и модифицированных. Данные отражены в таблице.

Таблица.

а) Дзета-потенциал спор *C. japonica*, не модифицированных и модифицированных синтетическими ПЭ

Образец	Число слоев	Концентрация полиэлектролита, г/л / масс. %	Дзета-потенциал, мВ
CJ K	0	-	21,7
CJ-PAH	1	1,088 / 0,1	10,7
CJ-PSS	1	1 / 0,1	17,34
CJ- PAH-5	1	5,44 / 0,5	22,25
CJ- PSS-5	1	5,03 / 0,5	15,89
CJ- PAH-10	1	10,2 / 1	22,4
CJ- PSS-10	1	10,13 / 1	22,43

б) Дзета-потенциал спор *A. sydowii*, не модифицированных и модифицированных синтетическими ПЭ

Образец	Число слоев	Концентрация полиэлектролита, г/л / масс. %	Дзета-потенциал, мВ
AS K	0	-	28,97
AS-PAH	1	1,088 / 0,1	38,88
AS-PSS	1	1 / 0,1	41,8
AS-PAH-5	1	5,44 / 0,5	32,02
AS-PSS-5	1	5,03 / 0,5	24,33
AS-PAH-10	1	10,2 / 1	61,18
AS-PSS-10	1	10,13 / 1	25,56

Из полученных значений дзета-потенциала, представленных в таблице, можно сделать вывод, что покрытие спор произошло; наблюдается изменение величины заряда поверхности при покрытие полианионом, а также изменение величины и знака заряда при покрытии поликатионом.

В нулевой точке споры C. japonica, как в контроле, так и модифицированные ПЭ, были крупными, с четко просматривающейся плотной клеточной стенкой (КС), имели округлую форму. Через 3 часа в контроле споры были большие, набухшие, с тонкой, четко видимой КС. У 5% спор, модифицированных РАН с концентрацией 0,1%, на 3-й час наблюдения отмечено появление ростовых трубочек. При увеличении концентрации РАН до 0,5% на 3-й час у спор отмечена плотная КС и

единичные набухшие споры с тонкой КС. При увеличении концентрации PAH до 1% изменений по сравнению с контролем не наблюдали. При обработке спор полианионом PSS с концентрацией 0,1% ростовых трубочек не отмечалось. При увеличении концентрации PSS до 0,5 и 1% споры оставались плотными, с хорошо просматриваемой КС.

На 4-й час проращивания споры в контроле были набухшими, с очень тонкой КС, внутреннее содержимое хорошо просматривалось. У спор, обработанных PSS с С = 0.1%, можно отметить единичные споры с точкой роста и появившейся ростовой трубочкой, а у спор, обработанных PAH с С = 0.1%, отмечено незначительное увеличение числа проросших спор. У спор, обработанных более высокими концентрациями PAH и PSS, набухшие споры с тонкой КС и единичные споры с ростовой трубочкой появились только к 5-му часу проращивания. На 6-й час в контроле наблюдалось 100% проросших спор, большинство из них имели уже длинные ростовые трубочки, и небольшое количество спор с зачатками проростков. У спор, обработанных PAH в С = 0,1%, ростовые трубочки разветвленные, имели по 2, 3, иногда и 4 отростка, в поле зрение попадали единичные споры с небольшими ростовыми трубочками. Споры, обработанные PSS в С = 0,1%, также были практически полностью проросшими (100%), с единичными набухшими спорами; ростовых трубочек меньше чем в контроле и значительно меньше, чем у спор, обработанных PAH. У спор, обработанных PAH с С = 0,5% и 1%, мы могли видеть как набухшие споры, так и споры с ростовые трубочки, но таких спор было не более 5% от общего количества. Эта же закономерность прослеживалась и для спор, обработанных PSS с С = 0,5% и 1%. На 7-й час проращивания у спор, обработанных PAH в С = 0,1%, наблюдался разветвленный мицелий, в то время как у спор, модифицированных PSS с концентрацией 0,1%, только разветвленные трубочки, а при покрытии спор C. japonica большими концентрациями ПЭ не отмечено увеличения количества набухших и проросших спор. Можно предположить, что (1) синтетический поликатион PAH в С = 0,1% стимулировал скорость и степень прорастания спор, (2) полианион PSS в С = 0,1% на скорость и степень прорастания влияния не оказывал, (3) более высокие концентрации, как поликатиона, так и полианиона, снижают скорость и степень прорастания спор.

Споры *A. sydowii* в нулевой точке, как контрольные, так и модифицированные, мелкие, округлые, с плотной КС. Через 12 часов проращивания в контроле было около 10% набухших спор и спор с короткими ростовыми трубочками; у спор покрытых С = 0,1% PAH и 0,1% PSS к данному времени можно увидеть порядка 40 и 50% проросших спор. У спор *A. sydowii*, покрытых PAH и PSS с С = 0,5%, через 12 часов

отмечено порядка 10 15% проросших спор, то же самое наблюдалось у спор, покрытых 1% растворами PAH и PSS. К 15 часу проращивания в контроле наблюдалось 100%-ое прорастание спор, так же как и у спор покрытых С = 0,1% PAH, тогда как у спор, обработанных PAH с С = 0,5% и 1%, отмечено прорастание примерно 60% спор, и споры имели четкие и плотные КС. Споры, покрытые PSS с С = 0,1%, так же были полностью (100%) проросшими к 15 часу проращивания; у спор, покрытых PSS с С = 0,5% и 1%, наблюдались как проросшие споры (примерно 30%), так и не проросшие. Можно предположить, что (1) PAH и PSS в С = 0,1% увеличивают степень прорастания спор, (2) покрытие спор PAH и PSS с С = 0,5% и 1% снижет степень прорастания спор.

В работе использовано оборудование Ресурсного центра оптической микроскопии и спектроскопии НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы

1. Феофилова Е.П., Ивашечкин А.А., Алёхин А.И., Сергеева Я.Э. Споры грибов: покой, прорастание, химический состав и значение для биотехнологии (обзор) //

Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 5 17.

2. Мысякина И.С., Кочкина Г.А, Иванушкина Н.Е., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Прорастание спор мицелиальных грибов в связи с экзогенным покоем // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 269 274.

3. Великанов Л.Л. Эволюция покоящихся стадий у грибов // Микология и фитопатология 1980, 14, 3. С. 256-259.

ВЫЯВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА НОВЫХ ШТАММОВ АГАРИКОМИЦЕТОВ В ПРОЦЕССЕ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Чернышенко В.С.[1], Максимова В.Ю.[1], Гурина С.В.[1], Ананьева Е.П.[1], Псурцева Н.В.[2]

[1]Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

[2]Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

Многие десятилетия внимание исследователей привлекают высшие базидиальные грибы, в частности представители агарикомицетов, как продуценты биомассы и биологически активных соединений для биотехнологического производства. Для лекарственных шляпочных и других макроскопических грибов известно около

130 фармакологических применений, включая противоопухолевое, иммуномодулирующее, антиоксидантное, связывающее свободные радикалы, кардиоваскулярное, снижающее холестерин в крови, противовирусное, антибактериальное, противопаразитное, противогрибковое, детоксифицирующее, гепатопротекторное и противодиабетическое действие. У базидиомицетов биологически активные вещества содержатся не только в плодовых телах, но также в мицелии и культуральной жидкости [1]. Несмотря на многообразие продуцируемых веществ и уже достигнутые результаты, высокий биотехнологический и терапевтический потенциал базидиомицетов продолжает привлекать ученых. Особое внимание привлекают полисахариды и вторичные метаболиты, включая вещества с антимикробной активностью и ферменты.

Цель данного исследования заключалась в определении перспективных базидиомицетов, которые могут быть использованы в биотехнологических исследованиях для производства мицелия и различных биологически активных веществ. В работе были поставлены следующие задачи: 1) сравнительное культивирование штаммов в глубинных условиях и изучение динамики накопления биомассы у наиболее активно растущих вариантов; 2) исследование антимикробной активность штаммов; 3) количественное определение накопления полисахаридов в культуральной жидкости в процессе глубинного культивирования.

Объектами исследования являлись штаммы различных видов базидиомицетов, включающих агарикоидные, афиллофороидные и гетеробазидиальные грибы. Образцы были собраны и выделены в культуру в 2021 году в Приморском крае на территории Уссурийского государственного природного заповедника им. В. Л. Комарова ДВО РАН и окрестных территорий.

Для проведения глубинного культивирования были выбраны штаммы с наиболее высокими показателями ростовых и ферментативных характеристик [2]. Штаммы прошли верификацию с помощью ПЦР-анализа и были введены в Коллекцию культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE-BIN).

Посевной материал выращивали в стерильных колбах объемом 500 мл, содержащих фарфоровые бусы и 100 мл солодового экстракта (солодовый экстракт 4%, pH 5,8-6,0), в течение 5-12 дней в зависимости от скорости образования пленки при 24±2 °C. Выросшую пленку мицелия разбивали при помощи бус путем интенсивного вращения колб до образования гомогенной суспензии мицелия.

Глубинное культивирование проводили в колбах Эрленмейера

объемом 250 мл на жидкой среде на круговом шейкере-инкубаторе BioSan ES-20 при 180 об/мин и 25 °С в течение 8-16 дней, визуально контролируя культуры на контаминацию в процессе всего периода культивирования. Выращивание штаммов проводили на среде следующего состава (г/л): пептон – 3, глюкоза – 10, MgSO4 – 0,5, CaCl2 – 0,05, KH2PO4 – 0,6, K2HPO4 – 0,4, ZnSO4 – 0,01, FeSO4 – 0,005, pH = 5,6 – 6,0, стерилизовали (ГК-100) 30 мин при 1 атм. Посевную суспензию вносили в асептических условиях (10% от объема питательной среды). После съема образцов культуральные жидкости (КЖ) пропускали через бумажный фильтр на вакуумной установке для фильтрования. В культуральном фильтрате определяли pH (Hanna pH 211) и уровень потребления глюкозы глюкозо-оксидазным методом с помощью коммерческого набора «КлиниТест-Глюкоза». Биомассу мицелия промывали дистиллированной водой и высушивали в течение 2-3 суток при 22 ± 2° С. Выход мицелия определяли весовым методом (Ohaus Adventurer). Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Office Excel, используя метод стандартного отклонения для расчёта погрешности. Полученные результаты по накоплению биомассы (г/л) представлены на рисунке 1.

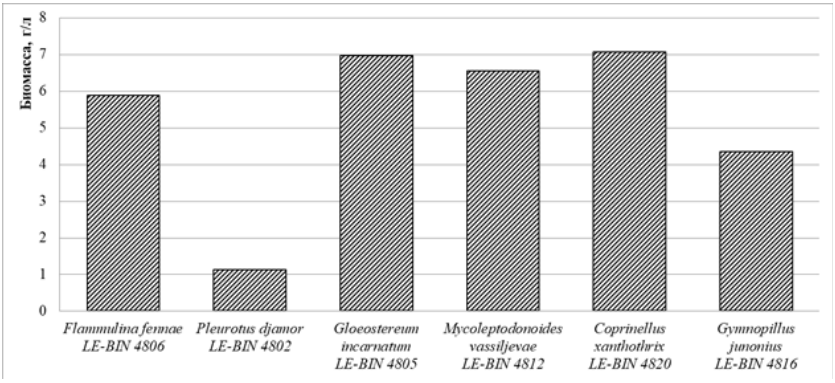


Рис. 1. Накопление биомассы (г/л) при глубинном культивировании штаммов, 8-ой день

Показано, что наибольшие значения воздушно-сухой биомассы были характерны для штаммов: *Coprinellus xanthothrix* LE-BIN 4820 (7,1 г/л), *Gloeostereum incarnatum* LE-BIN 4805 (7,0 г/л), *Flammulina fennae* LE-BIN 4806 (5,9 г/л), *Mycoleprodonoides vassiljevae* LE-BIN 4812 (4,9 г/л). Для данных штаммов была изучена динамика роста при культивировании в глубинных условиях.

В процессе культивирования штамма *Coprinellus xanthothrix* LE-BIN 4820 на 4, 7, 8, 9, 11, 16 и 17 дни роста в КЖ определяли значения pH и

концентрацию остаточной глюкозы. На рисунке представлены результаты глубинного культивирования на примере штамма *C. xanthothrix* LE-BIN 4820. Штамм обладал высокой скоростью прироста биомассы. Логарифмическая (экспоненциальная) фаза роста наблюдалась в течение первых 6 дней культивирования с активным накоплением биомассы и потреблением глюкозы. На 7-ой день культура вышла в стационарную фазу роста с небольшим увеличением биомассы на 1-2 г\л в течение последующих 4-х дней. Затем наступила фаза отмирания с постепенным уменьшением биомассы, также наблюдалось значительное потребление исходной глюкозы. Кислотность среды претерпевала незначительные изменения в процессе всего культивирования (Рис. 2).

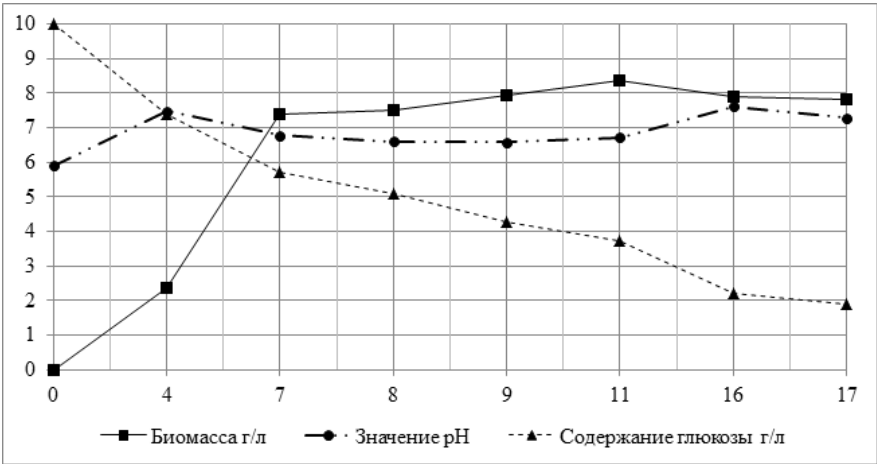


Рис. 2. Результаты культивирования в динамике штамма *Coprinellus xanthothrix* LE-BIN 4820

На 11-ый день культивирования штамма *Flammulina fennae* LE-BIN 4806 наблюдалось образование густой, вязкой КЖ, что свидетельствовало об образовании культурой внеклеточных полисахаридов [3]. Для выделения полисахаридов использовали метод их осаждения 96% этиловым спиртом. Культуральную жидкость объемом 100 мл разделяли на аликвоты по 10 мл и к каждой добавляли 30 мл 96% этилового спирта, тщательно перемешивали. Образовавшийся осадок пропускали через бумажный фильтр на вакуумной установке для фильтрования и высушивали на воздухе.

Количество редуцирующих сахаров после осаждения определяли колориметрическим методом, который основан на способности данных веществ восстанавливать бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолий хлористый до окрашенного трифенилформазана. В ампулу объемом

10 мл помещали 20 мг высушенную массу выделенных полисахаридов, затем добавляли 1 мл 8Н раствора серной кислоты. Ампулу запаивали и кипятили на водяной бане в течение 1 часа. После охлаждения содержимое ампулы количественно переносили в мерную колбу на 100 мл, устанавливали pH до 7 с помощью 1М раствора NaOH и доводили объем раствора до 100 мл дистиллированной водой, тщательно перемешивая. Для проведения анализа отбирали 0,4 мл полученного раствора, добавляли 0,2 мл 1М натрия гидроксида и 0,2 мл 0,3% водного раствора 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого. Пробирки закрывали ватными тампонами и выдерживали на кипящей бане в течение 3 минут. После этого пробирку охлаждали холодной водой, добавляли 0,2 мл 2М раствора уксусной кислоты и 5 мл 96% этилового спирта. Оптическую плотность исследуемого раствора измеряли на спектрофотометре (длина волны =490 нм, кювета с толщиной слоя 5 мм). Концентрацию редуцирующих сахаров определяли по стандартной кривой. Концентрация исследуемых полисахаридов в культуральной жидкости штамма *Flammulina fennae* LE-BIN 4806 на 11-ый день культивирования составила 0,89 мг/мл, что свидетельствует о наличии биосинтетического потенциала.

Антимикробную активность штаммов определяли в чашках Петри с помощью аппликации мицелиальных дисков на бактериальный газон со следующими видами микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Bacillus cereus*. Через 24 часа после начала эксперимента замеряли зоны вокруг мицелиальных дисков, на которых отсутствовал рост бактерий. Было показано, что внутриклеточные метаболиты штамма *Gloeostereum incarnatum* LE-BIN 4805 обладали активностью в отношении *B. cereus* (диаметр зон: 17,6 ± 0,2 мм) и *S. aureus* (диаметр зон: 23,5 ± 0,2 мм). В отношении грамотрицательной бактерии (*Escherichia coli*) антимикробная активность не была обнаружена.

Таким образом, в результате работы был изучен процесс глубинного культивирования новых штаммов агарикомицетов. Были выявлены наиболее перспективные штаммы для будущих биотехнологических разработок: *Gloeostereum incarnatum* LE-BIN 4805 имеет потенциал в качестве продуцента метаболитов с антимикробной активностью, *Coprinellus xanthothrix* LE-BIN 4820 может быть применен как продуцент гидролитических ферментов, *Flammulina fennae* LE-BIN 4806 перспективна для изучения гидролаз и полисахаридов, у штамма *Mycoleptodonoides vassiljevae* LE-BIN 4812 выявлен высокий уровень лакказной активности.

Работа была выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, проект БИН РАН № 122011900033-4.

Список литературы

1. Вассер С.П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». 2015. Т. 7, № 2. С. 238-248.
2. Максимова В.Ю., Чернышенко В.С. Исследование культурально-морфологических особенностей и выявление биосинтетического потенциала новых штаммов базидиальных грибов. Сборник материалов конференции «Молодая Фармация – Потенциал будущего». – 2022. – Т.1. – С. 526-530.
3. Urja Pandya, Umesh Dhuldai, Nirmal S. Sahay. Bioactive mushroom polyccharides as antitumor: an overview// Natural Product Research. 2018.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ТИТАНА НА БИОСИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ АМИЛАЗ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 06

Кондрук В.Ф, Чилочи А. А., Клапко С.Ф., Дворнина Е. Г., Лаблюк С.В.
Технический Университет, Молдова, Кишинев

Оценено влияние некоторых нанокомпозитов металлов титана, железа, цинка и меди с различными размерами и составом на процесс биосинтеза амилолитических внеклеточных ферментов микромицетом *Aspergillus niger* CNMN FD 06 - штамм биотехнологического значения. На основе полученных результатов, в качестве потенциальных стимуляторов амилолитической активности штамма - продуцента были отобраны наночастицы TiO2<100 нм и TiSiO4 <50 нм, CuO <50 нм, Cu (99,5%) размером 60-80 нм (Aldrich, Германия). Ряд авторов в своих работах отмечают выраженные свойства наночастиц стимулировать рост и биосинтез вторичных метаболитов у микроорганизмов-продуцентов, что открывает перспективу их использования в биотехнологии для управляемого культивирования микроорганизмов [1 - 5].

Целью данной работы было установить оптимальные концентрации отобранных наночастиц-биостимуляторов, исходное значение pH среды и продолжительность культивирования продуцента, обеспечивающие максимальный биосинтез амилаз штаммом *Aspergillus niger* CNMN FD 06 в погруженной культуре.

При проведении данных исследований наночастицы металлов вносились в стерильную питательную среду одновременно с посевным

материалом в концентрациях 5-15 мг/л для наночастиц меди и 10-20 мг/л в случае соединений титана, в зависимости от ранее полученных результатов. Наночастицы предварительно обрабатывались на ультразвуковой бане типа DA-968 DADI (Wildanger Technik, GmbH, Deutschland) в течение 5-10 мин до получения однородной дисперсии с целью предотвращения конгломератов. В качестве контроля служила среда, не содержащая наночастицы. Культивирование продуцента проводилось в течение 6 суток при температуре 28-300С в колбах Эрленмейера на 500 мл со 100 мл питательной среды в условиях постоянного перемешивания на качалках при 180-220 об/мин, на среде со следующим составом (г/л): крахмал - 3,0;фасолевая мука – 9,0, отруби пшеничные -18,0; KH2PO4 – 0,2; KCl – 0,5; Mg2SO4 – 0,5; исходное значение pH- 5,0. Амилолитическую активность в культуральной жидкости определяли колориметрическим методом с йодом [6], в динамике на 5-6 дни культивирования - период максимальной биосинтетической активности штамма-продуцента при культивировании в стандартных условиях. Математическую обработку данных проводили согласно методом Доспехова [7].

По данным, представленным в таблице установлено, что в контрольном варианте максимальная амилолитическая активность продуцента проявляется на 6-е сутки культивирования и составляет 79,58 ед/мл. В опытных вариантах самые высокие значения активности фермента на 6-е сутки отмечены у проб, культивируемых в присутствие наночастиц CuO <50 нм, 76,33-88,14 ед/мл, что составляет 95,92-110,75% к контролю с максимумом при концентрации 10 мг/л. В вариантах с наночастицами Cu 60-80 nm с увеличением концентрации наночастиц активность постепенно снижается, составляя 83,42 ед/мл в варианте, содержащем 5 мг/л соединения и 60,97 ед/мл при максимальной испытанной концентрация 15 мг/л. Следует отметить, что в вариантах с нано-CuO < 50 нм и нано-Cu 60-80 нм в концентрации 10 мг/л уже на 5-й день культивирования активность фермента составляет 86,49 и 88,49 ед/мл соответственно, превышая максимальный уровень контроля (6-ой день культивирования) на 8,68 и 11,19% соответственно. У обоих типов наночастиц меди стимулирующий эффект более выраженный при более низких тестируемых концентрациях: 76,91 и 86,49ед/мл при концентрации 5 и10 мг/л по сравнению с 66,96 ед/мл при максимальной 15мг/л в опытных вариантах с CuO < 50 нм и 78,45 ед/мл и 88,49 ед/мл при концентрации 5 и 10 мг/л по сравнению с 61,28 ед/мл при концентрация 15 мг/л в вариантах с Cu 60-80 нм.

Таблица. Влияние различных концентраций наночастиц меди и титана на амилолитическую активность микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06.

Наночастицы	Конц., мг/л	5-й день		6-й день	
		Активность, ед/мл	%, к контролю	Активность, ед/мл	%, к контролю
CuO <50 нм	5,0	76,91	123,80	83,42	104,82,
	10,0	86,49	139,21/108, 68*	88,14	1010,75
	15,0	66,96	107,79	76,33	95,92
Cu 60-80 нм	5,0	78,45	126,27	83,42	104,82
	10,0	88,49	142,43/111,19*	79,87	100,36
	15,0	61,28	98,63	60,97	76,6
TiO_2 <100 нм	5	77,08	124,06	68,23	85,74
	10	79,11	127,30	66,50	83,56
	15	81,44	130,44/102,34*	75,48	94 ,85
	20	78,29	126,49	72,37	90,93
$TiSiO_4$ <50 нм	5	76,59	123,27	69 ,25	87,02
	10	80,95	130,29/101,72*	78,24	98,32
	15	78,59	126,17	75,48	94 ,85
Martor	-	62,13	100,0	79,58	100,0

$p \leq 0,05$

*по отношению к максимальному значению контроля (79,58 ед/мл, 6-ой день культивирования)

Данные подтверждают эффективность применения наночастиц меди CuO <50 нм и Cu 60-80, в концентрации 10 мг/л, в качестве стимуляторов биосинтеза внеклеточных амилаз в технологии культивирования штамма микромицета *A. niger* CNMN FD 06. Использование наночастиц обеспечивает получение высокоактивных амилолитических ферментных препаратов в более короткие (на 24 часов) сроки культивирования.

При культивирование штамма в присутствии соединений титана TiO2 <100 nm и TiSiO4 <50 nm <100 nm максимум биосинтеза амилаз проявляется на 5-е сутки культивирования, энзиматическая активность варьировала в пределах 77,08-81,44 ед/мл. Во всех испытанных коцентрациях, активность амилаз превышает уровень контроля (123,27-130,44%), а при концентрации 15 и 10 мг/л в вариантах с TiO2<100 нм и TiSiO4 <50 нм, соответственно активность практически на уровне максимального значения контроля (6-ой день культивирования).

Наблюдаемые тенденции стимуляции и интенсификации синтеза амилолитических ферментов наночастицами TiO2<100 нм и TiSiO4<50

нм на 5-й день культивирования позволяют характеризовать тестируемые наночастицы титана как перспективные биостимуляторы биосинтеза внеклеточных амилаз у штамма мицелиального гриба *A. niger* CNMN FD 06.

В экспериментах по выявлению оптимальных значений исходного pH питательной среды обеспечивающих максимальный синтез внеклеточных амилаз, наночастицы меди и титана вносились в питательные среды с различным значением pH в пределах – 4,0; 5,0; 6.0 и 7.0 в отобранных оптимальных концентрациях – 5 и 10 мг/л для CuO <50 нм и Cu 60-80 нм и 10 и 15мг/л для TiO2<100 нм и TiSiO4 <50 нм. Контролем служила среда, не содержащая наночастицы, с исходным pH 5,0, выбранная ранее как оптимальная для обеспечения синтеза амилолитических ферментов при культивировании штамма *A. niger* CNMN FD 06 в стандартных условиях.

Согласно полученным результатам, оптимальное значение исходного pH, обеспечивающее максимальный синтез внеклеточных амилаз у микромицета *A. niger* CNMN FD 06 при культивировании продуцента в присутствие наночастиц меди аналогично оптимальному значению установленному раннее для культивирования микромицета в классических условиях – 5,0. Так, энзиматическая активность вариантов, на средах, содержащих CuO 50 нм и Cu 60-80 нм составляет 75,27 ед/мл (5-й день) и 81,47 ед/мл (6-й день) соответственно, 73,85 (5-й день) и 73,62 ед/мл на 6-й день по сравнению с 64,43 ед/мл и 84,09 ед/мл в контроле (рисунок).

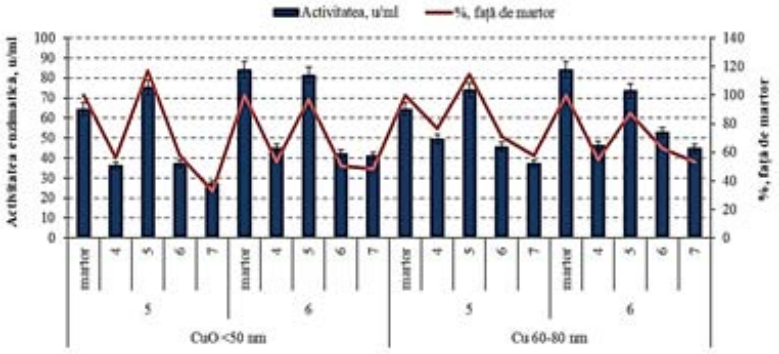


Рис. 1. Влияние наночастиц CuO 50 нм и Cu 60-80 нм в выбранных оптимальных концентрациях (5-10 мг/л) на амилолитическую активность микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06 в зависимости от различных значений pH среды

Положительный эффект, выявленный в предыдущих исследованиях, сохраняется, уровень активности опытных образцов с 5-го дня практически на уровне контроля, с 6-го дня снижение составляет всего 10,5-12,2%. Снижение или повышение значения pH питательной среды ниже/выше оптимального значения вызывает снижение активности фермента примерно на 30-70%, причем негативное влияние более выражено на 5-е сутки культивирования. Аналогичные результаты получены и в исследованиях с наночастицами титана.

Исследования выполнены в рамках проекта 20.80009.5007.28 при финансовой поддержке Национального Агентства по исследованиям и развитию.

Список литературы

1. Завигальский Г.Б., Котова В.Ю., Хрульнова С.А. и др. Оценка токсического действия наноматериалов на живые организмы. // Биотехнология, 2015, №6, с. 8-17.

2. Driouch H., Roth A., Dersch P., Wittmann C. Filamentous fungi in good shape: microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. // Bioeng. Bugs. 2011, Mar-Apr; 2(2): 100-4. Doi: 10/4161/bbug.2.2.13757.

3. Walisko R., Krull R., Schrader J., Wittmann C. Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bioproduction. // Biotechnol. Lett. 2012; 34:1975-1982. Doi: 10.1007/s10529-012-0997-1.

4. Чилочи А., Тюрина Ж., Лаблюк С., Дворнина Е., Клапко С., Бивол Ч., Гуцул Т., Русу Е. Особенности биосинтеза липаз микромицетом *Rhizopus* arrhizus CNMN FD 03 при использовании наночастиц окислов некоторых металлов // Buletinul A M, Seria tiin ele vie ii. 2017, 2(332), p. 116-125.

5. Otero-Gonzalez L., Garcia-Saucedo C., Field J.A., Sierra-Alvarez R. Toxicity of TiO2, ZrO2, FeO, Fe2O3, and Mn2O3 nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Chemosphere, 2013, 93, p. 1201–1206.

6. Рухлядева А.П.,Полыгалина Г.В.Методы определения активности гидролитических ферментов. М. М. Лёгкая и пищевая промышленность.1971, с.67-69.

7. Доспехов Б., Планирование полевого опыта и статистическая обработка данных. Москва, Колос, 1985 с. 192-196.

ЛАНОСТАНОИДЫ *INONOTUS OBLIQUUS* (ACH. EX PERS.) PIL T КАК СИНТОНЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Кукина Т.П.[1], Елшин И.А.[1,2]
[1]Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова
[2]Новосибирский государственный университет

Изучение биологической активности макромицетов привело к выделению и установлению структур терпеноидных соединений ланостановой структуры [1-2]. Разнообразие ланостановых соединений в грибах представлено карбокси-, гидрокси-, оксо-замещенными и секо-производными ланостерола [3]. В дереворазрушающих макромицетах был обнаружен ряд тритерпеновых кислот - пиниколовая, полипореновая, траметеноловая, тумулозовая, эбурикоевая и др. [1,3-5]. В процессе изучения биоактивных компонентов базидиального гриба чаги (*Inonotus obliquus*), используемого в народной медицине, идентифицированы ланостерол, инотодиол, траметеноловая кислота и траметеноловый альдегид, проявляющие различные биологические эффекты [3-9]. На сегодняшний день из чаги выделены несколько десятков тритерпеновых соединений ланостанового ряда, включая кислоты, альдегиды, кетоны, лактоны, соединения с несколькими двойными связями, с пятичленным циклом, эпоксиды, с кислородсодержащим пятичленным циклом. Ежегодно число идентифицированных соединений чаги растет, расширяется круг видов активности, проявляемых экстрактами, фракциями и индивидуальными компонентамичаги[7,10-19].Вприроднойчагеобнаруженыпентациклические тритерпены лупанового ряда: бетулин, лупеол, лупенон, а также эргостерол и родственные ему соединения, фитостерины: -ситостерол, стигмастерол, ситостанол, и холестерол, характерный для животных тканей [10].

В последнее время интерес к изучению экстрактов чаги вырос во всем мире в связи с тестированием их компонентов на различные виды активности. Наиболее широким спектром активности обладает инотодиол и его окисленные производные, как синтетические, так и природные [10-19].

Используя в качестве экстрагента метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ) получили липофильные экстракты. Пробоподготовка для ГХ-МС-анализа включала щелочной гидролиз с выделением кислых и нейтральных продуктов. Кислоты исследовали в виде метиловых эфиров, нейтральные компоненты – без дериватизации и в виде ацетатов. В результате сравнением с базами данных идентифицировали 3 тритерпеновых и 41 алифатических кислоты с длиной цепи от 14 до 28 атомов углерода, включая насыщенные, ненасыщенные, двухосновные и гидроксикислоты.

Неомыляемый остаток дополнительно фракционировали колоночной хроматографией, что позволило расширить спектр идентифицированных соединений. В неомыляемом остатке, помимо известных из литературы компонентов, впервые обнаружены 8 тритерпеновых соединений: ланоста-8,24-диен-3-он, 9,10-секо-эргоста-5,7,10(19),22-тетраен-3 -ол, неоэргостерол, ланоста-7,9(11),24-триен-3 -ол, 25-эпи-аплистерол, антраэргостатетраенол, 9(11)-дегидроэргостерол, стигмастанол [20]. Содержание основных компонентов неомыляемого остатка: ланостерола – 78.6 , инотодиола – 167.8 и траметенолового альдегида – 65.7 мг/100 г сырья. Колоночная хроматография кислых компонентов дала возможность идентифицировать еще одну тритерпеновую кислоту – траметеноновую, выделенную ранее из других макромицетов. В составе экстрактов чаги ранее не обнаружена. Содержание траметеноловой кислоты – 148.4 мг/100 г сырья, траметеноновой 22.4 мг/100 г сырья. Эти цифры выше, чем при применении других растворителей [21-22]. Практически количественное выделение целевых компонентов проведено при помощи колоночной хроматографии. Чистота продуктов тестировалась методом ГХ-МС. Далее проводилось эпоксидирование ланостаноидов в соответствии с методиками, описанными в работах [23-26]. Проведение эксперимента по эпоксидированию отражено в таблице 1.

Таблица 1. Эпоксидирование тритерпеноидов чаги МХНБК.

Компонент	Условия	Выход %	Соотношение :
-Ситостерин	**Избыток МХНБК,** CH_2Cl_2, 5 ч. **при 0°С**	87	1:3
-Ситостерина ацетат	**Избыток МХНБК,** CH_2Cl_2, 5 ч. **при 0°С**	89	1:5
Ланостерина ацетат	**Эквимолярное количество МХНБК,** CH_2Cl_2, 0.5 ч при 0**°С**	82, реакция в цепь	1:1.25
	Избыток МХНБК, CH_2Cl_2, 5 ч. **при 0°С**, 2 суток при -15°С	80, в цепь и кольцо	
Дигидроланостерина ацетат	**Избыток МХНБК,** CH_2Cl_2, 0,5ч при 0**°С** + 6ч при **к.т**.	60	Единственный продукт – -изомер
Инотодиол	**Избыток МХНБК,** CH_2Cl_2, 5 ч. **при 0°С**, 2 суток при -15°С	90, в цепь и кольцо	
Инотодиола диацетат	**Избыток МХНБК,** CH_2Cl_2, 5 ч. **при 0°С**, 2 суток при -15°С	90, в цепь и кольцо	
Ацетат траметенолового альдегида	**избыток МХНБК,** CH_2Cl_2, 5 ч. **при 0°С**, 2 суток при -15°С	90, в цепь и кольцо	
Ацетат метилового эфира траметеноловой кислоты	**Избыток МХНБК,** CH_2Cl_2, 5 ч. **при 0°С**, 2 суток при -15°С	60	1:1.3, Продукт реакции в кольцо не обнаружен

Далее для эпоксидов было проведено раскрытие цикла азидом натрия аналогично [24]. Проведение эксперимента отражено в таблице 2.

Таблица 2. Раскрытие эпоксидов азидом натрия (NaN_3, NH_4Cl, DMF, 90 **C**, > 90 часов).

Эпоксид компонента	Продукт эпоксидирования	Выход %	Соотношение продуктов раскрытия
-Ситостерина ацетат	-изомер	98	Продукт единственный
	-изомер	Реакция не идет	
Ланостерина ацетат	В цепь (один из изомеров)	93	1:1.3
Дигидроланостерина ацетат		Реакция не идет	
Инотодиола диацетат	В цепь и кольцо	76	Не определялось

Исходные стерины и тритерпеноиды, а также продукты эпоксидирования и раскрытия цикла азидом натрия переданы на испытания биоактивности.

Основные выводы.

1. Использование в качестве экстрагента МТБЭ приводит к более полному извлечению тритерпеновых компонентов чаги.
2. Фракционирование кислых и нейтральных частей экстрактов колоночной хроматографией расширяет круг идентифицированных компонентов.
3. Эпоксидирование и раскрытие цикла азидом натрия проходит аналогично литературным данным, но для компонентов с заместителями в цепи требует большего времени. Раскрытие эпоксида в положении 8,9 не идет в предложенных условиях.

Список литературы

1. Де Майо П. Терпеноиды. М. 1963, Из-во иностранной литературы. 495 с.
2. Племенков В.В. Химия изопреноидов. Калининград-Казань-Барнаул: Из-во Алтайского университета. 2007, 321 с.
3. Rios J.L., Andujar I. Lanostanoids from fungi as potential medicinal agents, Springer International Publeshing Switzerland, 2015. J.H. Merillon, K.G. Ramawat (eds.), Fungal metabolites, P. 931-964.
4. Ludwiczak R.S., Wrzeciono U. Badania skladnikow chemicznych *Inonotus obliquus*. Lanosterol (Lanostadienol) // Roczniki Chemii., Vol.34,

No.l, 1960, p.77 84.

5. Шиврина А.Н. Биологически активные вещества высших грибов. М-Л.: Из-во Наука, 1965, 199 с

6. Теплякова, Т. В., Косогова Т. А. Высшие грибы Западной Сибири - перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск : СибНСХБ, 2014. - 297 с. : ил.; 25 см.; ISBN 978-5-906143--61-7

7. Balandaykin M., Zdmitrovich I. Review on Chaga medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Higher Basidiomicetes): Realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential // Int. J. of Medicinal Mushrooms. 2015. Vol.17. No.2. Pp. 95 104.

8. Yusoo Sh., Yutaka T., Mioru T. Triterpenoids, steroids, and a new sesquiterpen from *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Bond. et Sing. // Int. J.of Medicinal Mushrooms. 2001. Vol. 3. Pp. 250.

9. Nakata T., Taji S., Yamada T., Tanaka R. New Lanostane Triterpenoids D and E from *Inonotus obliquus* // Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences. 2009. No.3. Pp. 53 56.

10. Никитина С.А., Хабибрахманова В.Р., Сысоева М.А.Химический состав и биологическая активность тритерпеновых и стероидных соединений чаги // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. вып. 4. С. 369-375.

11. Chung M.J., Chung C.K., Jeong Y., Ham S.S. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in Balbc/c mice bearing Sarcoma-180 cells // Nutr. Res. Pract. 2010, 4, Pp. 177–182.

12. Nomura M., Takahashi T., Uesugi A., Tanaka R., Kobayashi S. Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis // Anticancer Res. 2008, 28, Pp.2691–2696.

13. Zhang S.D., Yu L., Wang P., et al.Inotodiol inhibits cells migration and invasion and induces apoptosis via p53-dependent pathway in HeLa cells. // Phytomedicine 2019, 60, 152957.

14. Li Y. Zhang W., Chen *C. e*t al. Inotodiol protects PC12 cells against injury induced by oxygen and glucose deprivation/restoration through inhibiting oxidative stress and apoptosis. // J. Appl. Biomed. 2018, 16, Pp. 126–132.

15. Lee S.H., Won G.W., Choi S.*H. e*t al. Antiaging effect of inotodiol on oxidative stress in human dermal fibroblasts. Biomed. Pharmacother. 2022, 153, 113311.

16. Nguyen T.M.N., Ban S.Y., Park K.B. et al. Evaluation of Toxicity and Efficacy of Inotodiol as an Anti-Inflammatory Agent Using Animal Model. // Molecules 2022, 27, 4704.

17. Nguyen T.M.N., Lomunova M., Le B.V. et al. The mast cell stabilizing

activity of Chaga mushroom critical for its therapeutic effect on food allergy is derived from inotodiol. // Int. Immunopharmacol. 2018, 54, Pp. 286–295.

18. Nguyen T.M.N., Le H.S., Le B.V., Kim Y.H., Hwang I. Anti-allergic effect of inotodiol, a lanostane triterpenoid from Chaga mushroom, via selective inhibition of mast cell function. Int. Immunopharmacol. 2020, 81, 106244.

19. Ma L., Chen H., Dong P., Lu X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* // Food Chemistry. 2013, 139, 1–4, Pp.503–508.

20. Shcherbakov D.N., Kukina T. P., Elshin I.A., Panteleeva N.V., Teplyakova T.V. and Salnikova O. I. GC-MS Analysis of Lipophylic Chaga Mushroom Constituents // AIP Conference Proceedings 2390, 030083-1–030083-5; 2022 https://doi.org/10.1063/5.0070158

21. Слижов Ю.Г., Хасанов В.В., Чумаков А.А.. Химический состав компонентов водно-парового дистиллята и экстрактов, полученных с применением органических растворителей из сырья гриба чаги // Химия раст. сырья , 2015. № 2. С. 149-153.

22. Huing N., Beltrame G., Tarvainen M., Suomela J-P., Yang B. Supercritical CO2 Extraction of Triterpenoids from Chaga Sterile Conk of *Inonotus* obliqu.// Molecules 2022, 27(6), 1880;

23. Толстиков Г.А., Джемилев У.М., Гайлюнас И.А., Юрьев, В.П. // Журн. общ. химии. 1974. Т. 44. С. 215-220.

24. Finke A.O., Mironov M.E., Skorova A.B., Shults E.E. Copper-catalyzed 1,3- dipolar cycloaddition reaction of spirosolane-derived azide for the preparation of modified solasodine alkaloid // Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2018, 54. № 4. Pp. 411-416.

25. Ukiya M., Hayakawa T., Okazaki K., et al Synthesis of Lanostane-Type Triterpenoid N-Glycosides and Their Cytotoxicity against Human Cancer Cell Lines // Chem. Biodiversity 2018, 15, e1800113

26. Kavtaradze LK, Manley-Harris M, Nicholson BK. Efficient routes to epimerically pure side-chain derivatives of lanosterol // Steroids 2004, 69. 4. Pp. 227-233.

ОБРАЗОВАНИЕ И СВОЙСТВА КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS CLAVATUS* А16

Кулешова К. И., Попова Е. А.
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В последние годы население планеты быстро увеличивается, возрастает потребление продукции сельскохозяйственной промышленности. Это неизбежно приводит к увеличению объема агропромышленных

отходов, в том числе трудноразлагаемых, богатых кератином, таких как перья, шерсть, чешуя (Kothari et al., 2017). В настоящее время для их утилизации применяются экологически небезопасные методы – захоронение отходов на свалках, сжигание, химический гидролиз. Такие способы малоэффективны, так как перье-пуховые отходы медленно разлагаются, а при их сжигании в окружающую среду попадают токсичные вещества, CO, твердые частицы и сажа (Шестакова и др., 2021). Решением проблемы их утилизации является биоразложение с использованием протеаз - ферментов, продуцируемых живыми организмами. При этом происходит переработка отходов с получением полезных продуктов гидролиза - аминокислот, пептидов и растворимых белков, которые могут быть в дальнейшем использованы для создания удобрений, кормовых добавок для животных, биоразлагаемых пленок и клеев. Их разновидностью являются кератиназы – протеолитические ферменты, обладающие способностью к расщеплению нерастворимого белка кератина. Эти ферменты достаточно разнообразны по свойствам и синтезируются как прокариотическими организмами, такими как бактерии и археи, так и эукариотами – грибами. Кератиназы крайне важны для биотехнологического преобразования кератин-содержащих отходов, а также могут быть использованы для улучшения транспортировки лекарств к органам-мишеням и косметологических процедур, таких как устранение морщин, отметин и шрамов, ферментативного пилинга, механической чистки. (Srivastava et al., 2020). Кератиназы могут быть полезны в кожевенной, моющей и текстильной отраслях промышленности. Помимо этого, было выяснено, что кератиназы способны решать сложную проблему дезактивации прионов (Kothari et al., 2017). Таким образом, поиск новых продуцентов таких ферментов и их изучение является важной как научной, так и прикладной задачей.

Цель данной работы – изучить возможность использования микромицета *Aspergillus clavatus* A16 для промышленного получения кератиназ. Также дополнительно были изучены общая протеолитическая и коллагенолитическая активность.

Aspergillus clavatus – тропический/субтропический вид грибов, обитающий в возделываемых почвах, в созревшем компосте бытовых отходов, также известен ростом на долгохранящихся пищевых продуктах. Образует серовато-зеленые войлочные колонии диаметром около 25 - 54 мм с белым мицелием. Главная отличительная черта микромицета - булавовидные конидиальные головки, которые с возрастом разделяются на несколько столбиков (Klich, 2002). Для *A. clavatus* ранее была показана способность к образованию кератинолитических протеаз (Timorshina et

al., 2022), что обусловило выбор данной культуры для более подробного изучения.

Были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику накопления протеолитических ферментов с кератино-, коллганено- и казеинолитическими свойствами при глубинном культивировании *A. clavatus* на средах с разными источниками азота.
2. Получить комплексный препарат белков, выделяемых *A. clavatus*, и разделить его по фракциям с помощью метода изоэлектрофокусирования.
3. Изучить физико-химические и биохимические свойства кератинолитических протеаз с помощью методов электрофореза и зимографии.

Была изучена динамика накопления протеаз микромицетом *A. clavatus* на 14 средах с различными источниками азота. В качестве источников азота использовали нитрат натрия, гидролизат рыбной муки, измельченную щетину и перемолотое перо в разных соотношениях. В результате изучения динамики накопления протеаз были получены следующие результаты: максимальные значения активности кератиназы (96 ЕФА) были получены при культивировании на среде с пером, нитратом и ГРМ, однако пик активности для этой среды был достигнут лишь на шестые сутки. Также высокие значения активности были обнаружены на среде с щетиной (3), на среде с пером, щетиной и нитратом (7) и на среде с нитратом и щетиной (6). Разница в значениях кератинолитической активности протеаз, образуемых на этих средах, оказалась невелика, поэтому для дальнейшей работы была выбрана среда №7, поскольку при ее использовании накопление кератиназ происходило значительно быстрее, чем при использовании среды № 3, а относительные значения активности были выше, чем полученные на среде № 6. Культивирование микромицета *A. clavatus* на среде № 7 позволит перерабатывать одновременно отходы пера и щетины, а максимальный выход кератиназ уже на 3 сутки увеличивает потенциальную производственную эффективность.

Общую протеолитическую активность ферментов *A. clavatus* определяли с казеином с помощью модифицированного метода Ансона — Хагихары. Максимальные значения активности были выявлены на среде с щетиной (3), для которой также была показана высокая кератинолитическая активность. При этом пики активности совпадают во времени. Также высокая протеолитическая активность была обнаружена на средах № 7, 6 и 4 (соответственно в порядке убывания активности). При этом для сред № 6 и 7 пики активности

кератинолиза и казеинолиза совпадают, в то время как для среды № 4 пик кератинолитической активности был зарегистрирован на 2-е сутки, а казеинолитической - на третьи.

Далее *A. clavatus* культивировали на среде №7 и выделили белковый препарат методом высаливания. Белковый препарат разделили по фракциям с помощью метода изоэлектрофокусирования. По результатам ИЭФ выявили два пика кератинолитической активности – в кислой среде (pH=3) и в слабощелочной среде (pH=9). Нативный эф по Дэвису показал наличие единственной кератиназы. По результатам денатурирующего электрофореза было показано наличие трех пептидов в щелочной фракции, что позволяет предположить, что молекулярная масса кератиназы более 70 кДа. В кислой фракции белков обнаружено не было, что говорит о вероятном кислотном гидролизе кератина как причине регистрации кератинолитической активности. Щелочная фракция также была изучена зимографически, что позволило подтвердить наличие протеолитического фермента в ее составе.

Было выяснено, что оптимальное значение pH для выделенной кератиназы – 9. Кератиназа стабильна в широком диапазоне pH от 5 до 10. Оптимальная температура для работы данной кератиназы составляет 55 градусов. Фермент стабилен при температуре от 25 до 37 градусов, при дальнейшем повышении температуры активность фермента заметно снижается.

Ингибиторный анализ показал, что на данную кератиназу частично влияют ингибиторы для трипсиноподобных сериновых протеаз (соевый ингибитор трипсина). Из этого можно сделать вывод, что выделенная нами протеаза, предположительно, относится к классу трипсиноподобных сериновых протоеаз, однако необходимы дальнейшие исследования.

Также мы провели сравнение свойств выделенной нами кератиназы со свойствами описанной ранее кератиназы *Aspergillus clavatus* A16. Было обнаружено, что биохимические и физико-химические свойства этих протеаз отличаются достаточно сильно, в связи с чем можно говорить о потенциальном обнаружении новой кератиназы *Aspergillus clavatus* A16. Данная кератиназа является очень перспективной для использования в промышленности, т. к. ее активность значительно выше, она позволяет перерабатывать одновременно отходы пера и щетины с использованием дешевой среды, к тому же пик ее накопления приходится на 3 сутки.

Таким образом, в ходе данной работы была подобрана оптимальная недорогая среда для быстрого образования кератинолитических ферментов, что перспективно для биодеградации отходов сельского хозяйства. Также были изучены некоторые биохимические и физико-химические свойства выявленной протеазы. В дальнейшем планируется

подробнее изучить эти свойства для увеличения возможностей ее использования в биотехнологии.

Список литературы

1. Kothari, D., Rani, A., Goyal, A. 19 – Keratinases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Elsevier, 2017, P. 447-469.

2. Shestakova, A.; Timorshina, S.; Osmolovskiy, A. Biodegradation of Keratin-Rich Husbandry Waste as a Path to Sustainable Agriculture. Sustainability 2021, 13, 8691.

3. Srivastava, B., Khatri, M., Singh, G., & Arya, S. K. Microbial keratinases: an overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. Journal of Cleaner Production, 2020, 252, 119847.

4. Klich, M., A. Identification of Common *Aspergillus* Species, 2002.

5. Timorshina, S.; Popova, E.; Kreyer, V.; Baranova, N.; Osmolovskiy, A. Keratinolytic Properties of *Aspergillus clavatus* Promising for Biodegradation. Int. J. Environ. Res. Public Health 2022, 19, 13939.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОЛЛЕКЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ ВОСТОЧНОЙ ПАЛЕАРКТИКИ

Лиховидов В.Е.[1], Александрова А.В.[2], Юскевич В.В.[3]

[1]ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

[3]Научно-производственный центр «МикроМир», Любучаны

Для вовлечения в биотехнологию новых продуктов грибного синтеза необходимо проводить поиск микромицетов в природе, выделять их в чистую культуру, изучать различные свойства микромицетов, разрабатывать способы культивирования штаммов и технологии наработки грибных субстанций, получать метаболиты грибов, выделять из метаболитов чистые вещества, проводить оценку антагонистических свойств выделенных веществ, создавать коллекции микромицетов, которые будут способствовать сохранению перспективных для биотехнологии штаммов грибов.

С учётом вышеизложенного в ФБУН ГНЦПМБ были проведены целенаправленные исследования природных микромицетов по следующей методологии: проведение микологических экспедиций и поиск микромицетов в природе; изолирование и выделение в чистую культуру штаммов микромицетов; формирование коллекции и хранение штаммов микромицетов; изучение антагонистических свойств штаммов на тест-объектах медицинского, сельскохозяйственного и эпизоотологического значения; разработка технологических приемов

культивирования штаммов микромицетов; получение биомассы грибов с использованием различных приемов культивирования штаммов; экстрагирование биомассы грибов с целью получения метаболитов; фракционирование и очистка экстрактов грибов; выделение чистого вещества грибного синтеза; изучение химической структуры и свойств выделенных веществ; оценка антагонистической активности выделенных веществ.

В результате поиска, выделения, идентификации и сохранения грибов создана коллекция микромицетов Восточной Палеарктики. На сегодняшний день общий номенклатурный объём коллекции составляет 1576 штаммов, относящихся к 419 видам 132 родов. Все штаммы грибов паспортизованы. Коллекция микромицетов является составной частью общей государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» [1].

Исследовали антагонистические свойства 505 штаммов микромицетов, относящихся к 225 видам 115 родов. В качестве тест – объектов использовали штаммы микроорганизмов, относящиеся к разным группам патогенности для человека (СП 1.3.2322-08), различные фитопатогенные организмы и некоторые виды кровососущих комаров. Перечень тест-объектов, методики тестирования штаммов микромицетов на антимикробную и москитоцидную активность представлены в данной работе [2]. Активность штаммов грибов определяли по диаметру зоны подавления роста тест-культур. Была принята следующая шкала активности: высокая активность – диаметр зоны подавления от 21 мм и более; умеренная активность - диаметр зоны 10 - 20 мм; низкая активность - диаметр зоны до 10 мм.

В отношении возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*, вакцинный штамм СТИ 1, протестировано 505 грибных штаммов, относящихся к 225 видам 115 родов. Активными против *B. anthracis* оказались 105 штаммов, относящихся к 69 видам 33 родов [3]. Из них 20 штаммов показали высокую активность 80 штаммов оказались умеренно активными. Наибольшее количество высокоактивных штаммов обнаруживается среди почвенных грибов родов *Penicillium* и *Trichoderma*. Это штаммы с максимальными зонами подавления роста бактериального патогена: *P. vulpinum* F-1523 (40±4мм) и *P. chrysogenum* F-1621 (30±3мм);

T. hamatum F-11 (40±4мм) и *T. koningii* F-1402 (30±3мм). Грибы – антагонисты с высокой ингибирующей активностью отмечаются также в родах *Aspergillus*, *Hamigera*, *Paecilomyces*.

Штаммы с умеренной активностью присутствуют в родах *Beauveria*, *Geotrichum*, *Metacordyceps*, *Metarhizium*, *Ophiocordyceps Drechmeria*,

Harposporium, *Tolypocladium*, *Simplicillium*, *Stibella*, *Lecanicillium*, *Cosmospora*, *Fusarium*, *Nodulisporium*, *Purpureocillium*, *Pestalotiopsis*, *Polycephalomyces*, *Pseudallescheria*, *Rotiferophthora*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*.

В отношении возбудителя туляремии *Francisella tularensis*, вакцинный штамм 15/10,

протестировано 505 штаммов мицелиальных грибов. Антагонистические свойства в отношении возбудителя туляремии проявляли 95 культур. Из них 41 культура показала высокую активность, 54 штамма оказались умеренно активными [4]. Наибольшее количество активных штаммов отмечено в родах *Penicillium* (26 штаммов), *Trichoderma* (13 штаммов), *Fusarium* (8 штаммов), *Aspergillus* (8 штаммов) и *Metarhizium* (6 штаммов). Наиболее высокая активность отмечена для гриба *Clonostachys candelabrum* (50±5мм). Высокоактивными являются также штаммы *B. bassiana* (30±3мм), *A. pteridii* (30±3мм), *C. arbuscular* (35±3мм),

C. *berkeleyana* (30 ±3мм), *Fusarium oxysporum* (33±3мм), *H. fuscoatra* (32±3мм), *M. bolleyi* (30±3мм), *P. vulpinum* (42±4мм) *P. brevicompactum* (30±3мм), *P. chrysogenum* (30 ±3мм),

P. *lilacinum* (32±3мм), *T. harzianum* и *T. asperellum* (40±4мм).

В отношении бактерии *Staphylococcus aureus* B-4849 (метициллинрезистентный штамм) протестировано 505 коллекционных штаммов мицелиальных грибов. Выявили 120 штаммов, обладающих антибактериальной активностью. Они относятся к 64 видам 26 родов [5]. Наиболее активными штаммами являются: *Trichoderma viride* F-1290 (45±5мм), *Fusarium solani* F-1544 (44±5мм), *T. harzianum* F-123 (40±4мм), *Simplicillium lamellicola* F-496 (37±4мм), *S. lamellicola* F-852 (35±4мм), *Humicola fuscoatra* F-1546 (35±4мм), *Aspergillus raperi* F-1541 (32±4мм), *Sesgucillium candelabrum* F-114 (30±4мм), *Hamigera avellanea* F-1609 (30±3мм), *Simplicillium lamellicola* F-856 (28±3мм), *Clonostachys candelabrum* F-466 (27±3мм).

В отношении бактерии *Bacillus cereus* B-1447 протестировано 245 штаммов мицелиальных грибов. Выявлено наличие активности у 95 культур, которые относятся к 56 видам 25 родов [6]. Самые высокие зоны подавления роста бактериального патогена отмечены у микромицетов родов *Aspergillus*, *Beauveria*, *Clonostachys*, *Oedocephalum*, *Penicillium*, *Simplicillium*, *Trichoderma*. Наиболее активными и перспективными являются следующие штаммы микромицетов: *Penicillium chrysogenum* (30±3мм), *P. simplicissimum* (25±2 мм),

P. citrinum (25±2мм), *Aspergillus viridinutans* (25±2мм), *A. janus* (25±2мм), *Fusarium heterosporous* (27±3мм), *Trichoderma hamatum* (25±2мм), *T. longibrachiatum* (25±2 мм).

Из исследованных 505 штаммов микромицетов в отношении личинок кровососущих комаров *Aedes aegypti* активностью обладали 182 штамма, из которых 117 штаммов высокоактивные, 65 штаммов - умеренно активные [8]. Штаммы с высокой москитоцидной активностью присутствуют в родах *Aspergillus*, *Beauveria*, *Calcarisporium*, *Chrisosporium*, *Clonostachys*, *Cordyceps*, *Engyodontium*, *Evlachovaea*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Harposporium*, *Malbranchea*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Polycephalomyces*, *Penicillium*, *Simplicillium*. Впервые установлено наличие москитоцидной активности у представителей 8 родов микромицетов. Наивысшей активностью из этого списка обладали грибы *Calcarisporium arbuscula* F-80 (LC50 = 5,5 %, LT50 = 0,5 суток) и *Clonostachys. candelabrum* F-114 (LC50 = 8,5 %, LT50 = 0,5 суток).

Проведены работы по получению метаболитов из биомассы высокоактивных штаммов грибов. Выделенный из гриба *C. arbuscula* F-80 метаболит имеет молекулярную массу 460,517 и формулу C25H32O8. Его название по номенклатуре UIPAC: Ауровертин «В». По своей химической структуре это вещество является поликетидом (нанокетид). Москитоцидная активность Ауровертина «В» составляет: 2,5 – 41,0 ppm - для личинок и 3,7 - 11, 0 ppm - для куколок комаров. По шкале москитоцидной активности в отношении личинок комаров Ауровертин «В» не уступает активности химических инсектицидов [9].

Из экстракта гриба C. *candelabrum* F-114 был получен метаболит поликетидной природы (тетракетид). Это вещество имеет молекулярную массу 164 и формулу C10H12O4. Его название по номенклатуре UIPAC: 2, 3 - диметокси - 5, 6 - диметил - бензохинон. Москитоцидная активность 2, 3 - диметокси 5, 6-диметил бензохинона составляет: 15-110 ppm - для личинок и 28-405 ppm - для куколок комаров. По шкале москитоцидной активности в отношении личинок комаров 2,3-диметокси 5,6-диметил бензохинон не уступает активности химических инсектицидов [10].

Из культуральной жидкости гриба *Simplicillium lamellicola* F-738 выделена фузидиевая кислота, обладающая высокой селективной активностью в отношении бактерии *Staphylococcus aureus*. Определена минимальная действующая концентрация вещества, которая составляет 0,05 мкг.

Проведены исследования по получению субстанций на основе мицелиальных грибов и проведены их лабораторные испытания в отношении сибиреязвенного микроба. В работе использовали штаммы мицелиальных грибов родов *Trichoderma* и *Penicillium*, наиболее активных в отношении *B. anthracis*. Технологические приемы культивирования грибов и методика тестирования грибных субстанций изложены в данной работе [11]. Установлена высокая активность грибных субстанций

в виде фугата культуральной жидкости (ФКЖ), полученных на основе штаммов *Trichoderma hamatum* F-11 (40±5мм), *T. asperellum* F-1290 (30±4мм), *T. koningii* F-1402 (28±4мм) *Penicillium vulpinum* F-1523 (30±3мм) и *Penicillium brevicompactum* F-1565 (30±3мм). Указанные грибные субстанции обладали активностью уже через 24 ч культивирования. Отобрано 2 штамма – *Trichoderma hamatum* F-11, и *Penicillium vulpinum* F-1523 в качестве штаммов – продуцентов для разработки новых биопрепаратов, предназначенных для борьбы с возбудителем сибирской язвы в природных очагах его распространения [12].

Проведены исследования по получению субстанций на основе мицелиальных грибов и их лабораторные испытания в отношении туляремийного микроба *Francisella tularensis* 15/10. Установлено, что из 15 протестированных грибных субстанций высокая активность отмечена для ФКЖ, полученных из 12 штаммов грибов [13]. Наибольшую активность показали грибные субстанции пяти штаммов: *Clonostachys candelabrum* F-1466 – (50±5 мм), *Penicillium brevicompactum* F-1565 – (42±5мм) *Eupenicillim sp.* F-1759 – (34±4мм); *Purpureocillium lilacinum* F-1550 – (32±4мм); *Humicola fuscoatra* F-1546 – (32±4мм).

Получены экспериментальные образцы грибных препаратов на основе активных штаммов грибов *T. hamatum* F-11 и *P. vulpinum* F-1523 и проведены их лабораторные испытания в отношении возбудителя сибирской язвы. На основании результатов опытов по оценке влияния на культуру грибов различных консервантов, стабилизаторов и эмульгаторов составлена рецептура грибных препаратов, состоящей из культуры гриба, уксусной кислоты в качестве консерванта, олеиновой кислоты и твина 80 соответственно в качестве стабилизатора и эмульгатора. На основе штаммов грибов *P. vulpinum* F-1523 и T. *hamatum* F-11 получены экспериментальные образцы препаратов в виде КЖ, фугата КЖ и пасты. Экспериментальные образцы препаратов показали высокую активностью (25-30мм) в отношении *B. anthracis* СТИ-1 [11].

В заключение следует отметить, что к настоящему времени скринингом на антагонистическую активность охвачено немногим более 35 % штаммов микромицетов от общего их количества в коллекции «ГКПМ-Оболенск». Следует ожидать, что по мере увеличения объема скрининга будет выявлен целый ряд штаммов микромицетов перспективных для использования в биотехнологии грибного синтеза.

Список литературы

1. Лиховидов В.Е. Микромицеты Восточной Палеарктики в коллекции «ГКПМ Оболенск» / Лиховидов В.Е., Александрова А.В., Юскевич В.В. // Современная микология в России. Том 8. Материалы 4-го

Международного микологического форума. М.: Национальная академия микологии, 2020. С. 39-42.

2. Юскевич В.В. Формирование коллекции природных микромицетов и выявление штаммов с антибактериальными и москитоцидными свойствами // Автореф. канд. дисс. - Оболенск, 2012. – 26 с.

3. Лиховидов В.Е. Почвенные микромицеты как потенциальные агенты биоконтроля сибиреязвенного микроба в природных очагах его распространения. / Лиховидов В.Е., Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Храмов М.В., Быстрова Е.В. // Успехи медицинской микологии. – 2016. – Т.XVI. – С. 71-78.

4. Лиховидов В.Е. Оценка мицелиальных грибов и их субстанций на активность в отношении возбудителя туляремии. / Лиховидов В.Е., Мокриевич. А.Н., Вахромеева Г.М., Павлов В.М., Юскевич В.В., Володина Л.И. // Успехи медицинской микологии. – 2014. –Т. XII. - С. 318-320.

5. Лиховидов В.Е. Антимикробная активность штаммов микромицетов в отношении возбудителей госпитальных инфекций / Лиховидов В.Е., Александрова А.В., Быстрова Е.В., Храмов М.В. // Современная микология в России. – 2017. – Т VII. – С. 242 – 245.

6. Лиховидов В.Е. Штаммы микромицетов с антагонистическими свойствами в отношении бактерии *Bacillus cereus* / Лиховидов В.Е., Александрова А.В., Юскевич В.В. // Современная микология в России. – Т. 9. Материалы 5 Съезда микологов России. – М.: Национальная академия микологии, 2022. - С. 200-202.

7. Лиховидов В.Е. Антагонистическая активность штаммов мицелиальных грибов в отношении возбудителя кандидоза *Candida albicans* / Лиховидов В.Е., Володина Л.И., Юскевич В.В., Александрова А.В., Быстрова Е.В. // Успехи медицинской микологии. – 2013. –Т. XI. -С. 324-326.

8.. Юскевич, В.В. Формирование коллекции природных микромицетов и выявление штаммов с антибактериальными и москитоцидными свойствами // Дис... канд. биол. наук. – Оболенск, 2012. – 205 с.

9. Лиховидов В.Е. Метаболит гриба *Calcarisporium arbuscula* F-80 Ауровертин «В», обладающий москитоцидными свойствами / Лиховидов В.Е., Александрова А.В. // Успехи медицинской микологии. – 2018. –Т. XIX. - С. 153-157.

10. Лиховидов В.Е. Метаболит гриба Sesquicillium *candelabrum* F-114, 2,3-диметокси 5,6-диметил бензохинон, обладающий москитоцидными свойствами / Лиховидов В.Е., Александрова А.В. // Успехи медицинской микологии. – 2018. –Т. XIX. - С. 147-151.

11. Лиховидов В.Е. Микромицеты как потенциальные агенты биоконтроля возбудителей особо опасных инфекций. / Лиховидов

В.Е., Маринин Л.И., Шишкова Н.А. // Экологичные средства борьбы с патогенами человека, животных и растений / Под редакцией акад. И.А. Дятлова. - М: ООО Буки Веди. - 2019. – С. 121 – 140.

12. Лиховидов В.Е. Антибактериальная активность субстанций мицелиальных грибов в отношении возбудителя сибирской язвы. / Лиховидов В.Е., Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Храмов М.В., Быстрова Е.В. // Успехи медицинской микологии. – Материалы III международного микологического форума. – 2015. – Т.XIV. – С. 437-441.

13. Лиховидов В.Е. Получение грибных субстанций и их лабораторные испытания на активность в отношении возбудителя туляремии / Лиховидов В.Е., Мокриевич. А.Н., Вахромеева Г.М., Быстрова Е. В. // Успехи медицинской микологии. – Материалы III международного микологического форума. -2015. –Т. XIY. - С. 442-445.

БИОКОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ДЕЙСТВИЕМ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ФУЗИДИНА НАТРИЯ

Лияськина Е.В.[1], Маврина А.С.[1], Лияськина А.Ю.[2], Тишкин А.А.[1], Ревин В.В.[1]

[1]МГУ им. Н.П. Огарева, Саранск

[2]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

Разработаны биокомпозиционные материалы медицинского назначения с антибактериальным действием на основе бактериальной целлюлозы и антибиотика фузидина натрия в форме гидрогелей, аэрогелей и пленочных форм. Полученные биокомпозиты обладают высокой антибактериальной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и низкой цитотоксичностью, что делает их перспективными кандидатами для получения раневых покрытий и использования в тканевой инженерии.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, фузидовая кислота, антибиотики, биокомпозиты, раневые покрытия

Бактериальная целлюлоза (БЦ) обладает многими превосходными свойствами для заживления ран и действует как эффективный физический барьер для бактериальной инфекции [1-3], но отсутствие антибактериальной активности ограничивает ее применение в качестве раневых покрытий. Биофункционализация БЦ антибактериальными препаратами и другими антимикробными агентами может решить эту проблему [4,5]. Так, в настоящее время получен ряд материалов медицинского назначения с антибактериальным действием основе

БЦ и антибиотиков (тетрациклин, гентамицин, амоксициллин, амоксиклав, ципрофлоксацин, цефтриаксон, ванкомицин и др.) [5-9]. Глобальная проблема повышения устойчивости к противомикробным препаратам привела к возобновлению интереса к фузидовой кислоте (ФК) [10,11]. ФК – антибиотик, образуемый грибом *Fusidium coccineum*, который принадлежит к классу стероидов, но не обладает гормональной активностью [12]. ФК широко используется в системном и местном лечении стафилококковых инфекций кожи, мягких тканей, костей, суставов, включая штаммы резистентные к пенициллину и другим антимикробным препаратам, являясь альтернативой для лечения заболеваний, вызванных метициллинорезистентными штаммами (MRSA) [13,14]. При наружном применении она глубоко проникает в кожу в области пораженных участков. Кроме того, ФК гиппоаллергенна, имеет низкую токсичность, резистентность и не имеет перекрестной резистентности с другими клинически используемыми антибиотиками [12]. В последние годы в литературе появились сообщения о том, что ФК оказывает ингибирующее действие на образование биопленок *S. aureus* [10]. Она может эффективно снижать вирулентность *S. aureus* путем ингибирования экспрессии -токсина [15]. Пероральная ФК в настоящее время привлекает особое внимание для лечения кожных и ортопедических инфекций, в которых биопленки играют главную роль [10]. Помимо антибактериального, ФК обладает слабым иммуномодулирующим действием, которое связывают с подавлением продукции и секреции цитокинов, особенно интерлейкинов, фактора некроза опухолей. В клинических концентрациях она является ингибитором хемотаксиса нейтрофилов и подавляет функцию Т-лимфоцитов. Наиболее активным производным ФК является натриевая соль (фузидин натрия), которая впервые была использована клинически для лечения стафилококковых инфекций.

На кафедре биотехнологии, биохимии и биоинженерии Национального исследовательского Мордовского государственного университета разработаны биокомпозиционные материалы медицинского назначения с антибактериальным действием на основе бактериальной целлюлозы и антибиотика фузидина натрия в форме гидрогелей, аэрогелей и пленочных форм [5,16-18]. БЦ была получена с помощью штамма бактерии *Komagataeibacter sucrofermentans* Н-110, который был выделен из чайного гриба, идентифицирован на основании анализа 16S рРНК и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером *K. sucrofermentans* ВКПМ В-11267 [19]. Для получения гидрогелей предварительно очищенную гель-пленку БЦ механически измельчали. Для придания антимикробных свойств

в композит добавляли антибиотик фузидин натрия в концентрации 200 мкг/г гидрогеля. Для получения аэрогелей полученные гидрогели замораживали в низкотемпературном холодильнике MDF-U53V (SANYO, Япония) при – 50 С в течение суток и высушивали на лиофильной сушилке Freeze Dryer (Labconco, США). Антибактериальную активность композитов исследовали диффузионным методом дисков в отношении грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* 209 P. Показано, что полученные биокомпозиты обладают высокой антибактериальной активностью в отношении *S. aureus*. Зоны отсутствия роста тест-микроорганизма для пленок и гидрогелей составили 30–33 мм, для аэрогелей – 27–28 мм. Исследование цитотоксичности было проведено для изучения влияния фузидина натрия в матрице БЦ на пролиферацию культуры клеток фибробластов мыши L929, жизнеспособность которых оценивали методом МТТ-анализа. Все материалы продемонстрировали незначительную токсичность. Не было отмечено снижения жизнеспособности клеток и изменения их морфологии. Изложенное позволяет включить ФК в один ряд с современными антибактериальными препаратами и рекомендовать ее для получения материалов медицинского назначения, особенно при инфекциях, вызванных метициллинорезистентными штаммами *S. aureus*.

Список литературы

1. Moradpoor H., Mohammadi H., Safaei M. et al. Recent Advances on Bacterial Cellulose-Based Wound Management: Promises and Challenges. Int. J. Polym. Sci. 2022. Vol.1. P. 1214734.

2. Jankau J., B a y ska-Spychalska A., Kubiak K. et al. Bacterial Cellulose Properties Fulfilling Requirements for a Biomaterial of Choice in Reconstructive Surgery and Wound Healing. Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. Vol. 9. P. 805053.

3. de Amorim J.D.P., da Silva Junior C.J.G., de Medeiros A.D.M. et al. Bacterial Cellulose as a Versatile Biomaterial for Wound Dressing Application. Molecules. 2022. Vol. 27. P. 5580.

4. Zheng L., Li S., Luo J., Wang X. Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Antibacterial Materials as Wound Dressings. Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 593768.

5. Revin V.V., Liyaskina E.V., Parchaykina M.V. et al. Bacterial Cellulose-Based Polymer Nanocomposites: A Review. Polymers. 2022. Vol. 14. P. 4670.

6. Громовых Т.И., Садыкова В.С., Луценко С.В. и соавт. Бактериальная целлюлоза, синтезируемая Gluconacetobacter hansenii, для использования в медицине. Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53, № 1. С. 69–75.

7. Volova T.G., Shumilova A., Shidlovskiy I.*P. e*t al. Antibacterial properties

of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics. Polym. Test. 2018. Vol. 65. P. 54–68.

8. Volova T.G., Prudnikova S.V., Kiselev E.G. et al. Bacterial Cellulose (BC) and BC Composites: Production and Properties. Nanomaterials. 2022. Vol. 12. P. 192.

9. Cacicedo M.L., Pacheco G., Islan G.A., Alvarez V.A., Barud H.S., Castro G.R. Chitosan-bacterial cellulose patch of ciprofloxacin for wound dressing: Preparation and characterization studies. Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 147. P. 1136–1145.

10. Siala W., Rodriguez-Villalobos H., Fernandes P., Tulkens P. M., Van Bambeke F. Activities of combinations of antistaphylococcal antibiotics with fusidic acid against staphylococcal biofilms in in vitro static and dynamic models. Antimicrob. Agents Chemother. 2018. Vol. 62. *P. e*00598-18.

11. Hajikhani B., Goudarzi M., Kakavandi *S. e*t al. The global prevalence of fusidic acid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2021. Vol.10. P. 75.

12. Curbete M.M., Salgado H.R.N. A critical review of the properties of fusidic acid and analytical methods for its determination. Crit. Rev. Anal. Chem. 2016. Vol. 46. P. 352–360.

13. Fernandes *P. F*usidic acid: a bacterial elongation factor inhibitor for the oral treatment of acute and chronic staphylococcal infections. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2016. Vol. 6. *P. a*025437.

14. Wu P-P., He H., Hong W.D. et al. The biological evaluation of fusidic acid and its hydrogenation derivative as antimicrobial and anti-inflammatory agents. Infect. Drug Resist. 2018. Vol.11. P. 1945

15. Liu L., Shen X., Yu J. et al. Subinhibitory Concentrations of Fusidic Acid May Reduce the Virulence of *S. aureus* by Down-Regulating sarA and saeRS to Reduce Biofilm Formation and -Toxin Expression. Front. Microbiol. 2020. Vol. 11. P. 25.

16. Liyaskina E., Revin V., Paramonova E. et al. Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. J. Phys. 2017. Vol.784. P.012034.

17. Revin V.V., Nazarova N.B., Tsareva E.E. et al. Production of Bacterial Cellulose Aerogels With Improved Physico-Mechanical Properties and Antibacterial Effect. Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 603407.

18. Revin V.V., Parchaykina M.V., Upyrkina K.*S. e*t al. Effect of biocomposites on bacterial cellulose-based hydrogel and physiologically active compounds on regeneration processes in the skin's lipid phase after burn injury. Opera Medica et Physiologica. 2022. Vol. 9. P. 72-91.

19. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Сапунова Н.Б., Богатырева А.О.

Выделение и характеристика штаммов - продуцентов бактериальной целлюлозы. Микробиология. 2020. Т. 89, № 1. С. 88–98.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГРИБНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ОРГАНИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Нугманова Т.А., Кабаргина М.В., Кабаргин Л.А.
ООО « БИОИН-НОВО», Москва

Факты подтверждают, что экологическая обстановка в мире и климат за последнее 10-летие резко ухудшились и вместе с тем, растет население планеты. Без сдерживания интенсивности к 2100 году население планеты может увеличиться с 7,8 до 15 млрд. чел. Обеспечить такое количество людей пищей можно только при интенсивном промышленном сельском хозяйстве и минимизации потерь в этой отрасли. Однако именно интенсификация сельского хозяйства, способная обеспечить людей в полной мере пищей, является одной из главных причин деградации почв, природных ресурсов, воды, воздуха, снижения качества пищи, обострений известных и появления новых заболеваний человека. В этом плане, возврат к природе, бережное к ней отношение, в том числе к почве - основе сельского хозяйства, рассмотрение почвы как живого организма – такой подход не просто рационален - он единственный и необходимый.

В этом плане использование биотехнологии в части разработки разнообразных микробиологических препаратов: биоинсектицидов, биофунгицидов, биостимуляторов роста, корнеобразователей и биоудобрений является важнейшей составной частью интенсивного сельского хозяйства. Среди микробиологических препаратов грибного происхождения важнейшее значение имеют грибы - симбионты, как эндофиты, обитающие внутри растений, так и эктофиты, обитающие на корневой системе и создающей микоризу. Среди микрофлоры, населяющей растения внутри, найдены бактерии, дрожжи, актиномицеты, а также грибы [1-3]. Изучение бактерий-эндофитов показало, что доминируют *Bacillus pumius*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *P. Fluorescens*, а также род *Stenotrophomonas.* Эдофитные грибы представлены разными родами. Широко известны микоризные препараты из грибов *Neotyphodium* как продуценты биологически активных веществ, обеспечивающих в симбиозе растению увеличение корневой системы, повышение питания фосфором, витаминами, аминокислотами,

микроэлементами, сопротивляемость неблагоприятным абиотическим факторам. Кроме этого, изучены биологически активные формы грибов рода *Phomopsis spp.*, синтезирующие цитохалазаны. *Phomopsis sp.*- продуцент вещества антимикробного действия - фомопсихалазина, эффективного против бактериозов риса, эндофитный гриб *Cylindrocarpon sp.* – источник циклопептидного антибиотика цилиндроциклина, активного против нематод [4]. Многие эндофитные грибы продуцируют антибиотики, активно подавляющие не только возбудителей заболеваний растений, но и человека.

Periconia *sp.*, выделенный из перца *Piperlongum L.*, синтезирует биологически активное вещество алкалоидной природы - пиперин, обладающий высокой антибиотической активностью в отношении возбудителей туберкулёза *Mycobacterium tuberculosis.* Гриб-эндофит *Mycosphaerella sp.* - продуцент церкоспорина, выделенный из тропического растения *Psychotria horizontalis* обладал антипаразитарной активностью в отношении возбудителя малярии, *Pestalotiopsis photiniae* выделенный из пальмы *Roystonea regi,* продуцировал фотипирон, показавший цитотоксическую активность в отношении клеточной линии рака человека. Соединения цитоновой кислоты синтезируются эндофитным грибом *Cytonaema sp.*, ингибируют протеазы человеческого цитомегаловируса. Практически многие растения имеют эндофитные грибы и все они синтезируют биологически активные вещества разной природы.

Грибы-эндофиты продуцируют огромное количество разнообразных антибиотиков и подобных веществ, подавляющих возбудителей болезней человека и растений. Некоторые из них: криптокандин, амбуиновая кислота, песталозид, песталотиопсины, гумулан, коллетотриковая кислота, фомопсихалазин, фузаристатин.

Известна роль грибов рода *Fusarium* и их токсинов в развитии патологических процессов в организме человека, животных и растений (фузариозы). Наибольшую опасность представляют фузариотоксины: Т-2 токсин, НТ-2 токсин, дезоксиниваленол, ниваленол, диацетоксисцирпенол, монилиформин. Они являются провокаторами канцерогенеза, индуцируют повышенную активность патогенных вирусов, бактерий, грибов и простейших, вызывают изменения метаболизма и химического состава культурных растений. Вместе с тем, имеются обратные факты: изучается действие фузариума и его метаболитов в подавлении развития раковых клеток, проявлении антагонистической активности по отношению к ряду вирусов, патогенных бактерий, грибов и простейших, как сорбентов и деструкторов поллютантов, стимуляторов роста и повышении иммунитета растений.

№ образца	Праймер	Последовательность	Видовая принадлежность
09	ctggtcatttagaggaagtaa	TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCC GTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTC CCAAACCCCTGTGAACATACCTTACTGTTGCCTCGGCGGATC AGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCC CTAAACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAAACCATAAAT AAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG CCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAAC CCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTTGGGGATCGGCGAGCCTT TCTGGCAAGCCGGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGC AGCCTCCATTGCGTAGTAGTAAAACCCTCGCAACTGGAACGC GGCGCGGCCAAGCCGTTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGAC CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AAAGGCGGAGGAA	*Fusarium redolens*[100%]
41	ctggtcatttagaggaagtaa	TCTTGGTCATTTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTC CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACT CCCAAACCCCTGTGAACATACCTTTATGTTGCCTCGGCGGAT CAGCCCGCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCGCAGGAAA CCCTAAACTCTGTTTTTAGTGGAACTTCTGAGTATAAAAAACA AATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC CGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCA ACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTTGGGATCTGTCCTTACCGAC AGTCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCG TAGTAATTTACACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCC GTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGG AATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGGCCGGAGGAA	*Nectriaceae*[100%] *Fusarium*[100%] *Fusarium sporotrichioides*[81%]
42	ctggtcatttagaggaagtaa	TCTTGGTCTCAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTG GTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACTCCCAA ACCCCTGTGAACATACCACTTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCC GCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAA ACTCTGTTTCTATATGTAACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAAT CAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA AGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGT ATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCA AGCACAGCTTGGTGTTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTC AAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGT AAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAA CCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	*Hypocreales*[100%] *Nectriaceae*[100%] *Fusarium*[100%] *Fusarium oxysporum* f sp niveum[83%]

Известно использование непатогенных штаммов *Fusarium sp.* для защиты растений от возбудителей болезней. Установлено, что механизм действия непатогенного *Fusarium sp.* возможно основано на конкуренции и индукции системной устойчивости. Конкуренция с другими видами патогенных грибов и бактерий может основываться на сапротрофной борьбе за питательные вещества в почве и ризосфере [5]. В нашей работе мы использовали непатогенные штаммы

Fusarium, выделенные из здоровых растений (стерильных корней) монарды (№ 9), рябины (№ 41) и иван-чая (№ 42). Анализ молекулярной идентификации по Сенгеру ITS1/2 фрагмента кластера рибосомальных генов показал, что штаммы могут быть идентифицированы как *Fusarium redolens*, *Fusarium sporotrichioides* и *Fusarium oxysporum* f *sp.* niveum соответственно, табл.1. Разработанный способ глубинного культивирования штаммов и анализ биологической активности метаболитов этих культур показал, что экстракт в концентрации 10-4 степени стимулирует рост семян на 69 %. Так, на 8 день выращивания, эффект увеличения длины стебельков на пшенице составил 166 %, на горохе 22 %, а вес зеленой массы увеличен на 250 и 83 % соответственно. Образцы биопрепаратов, приготовленные на их основе увеличивали продуктивность разных растений: зерновых, овощей, фруктов и кормовых трав на 12-68 %.Проведенные полевые испытания показали наличие и других эффектов: сокращение сроков созревания на 1,5-2 недели, увеличение всхожести семян, сопротивляемости болезням и вредителям, улучшение товарных свойств корнеплодов, возможность существенного снижения пестицидной нагрузки. Таким образом, использование грибов-эндофитов как перспективных продуцентов биотехнологических продуктов для растениеводства очевиден.

Список литературы

1. Гельцер Ф.Ю. Симбиоз с микроорганизмами-основа жизни растений. Издат. МСХА, Москва, 1990,С.132.

2. Благовещенская Е.Ю. Эндофитные грибы злаков, диссертация к.б.н., Москвы, 2006.

3.Чеботарь В.К., Щербаков А.В.,Щербакова Е.Н.,Масленникова С.Н.,Заплаткин А.Н.,Мальфанова Н.В. Эндофитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие.2015г, ж. Сельскохозяйственная биология, т.50,№ 5, с.648-654.

4.Мачавариани Н.Г.,Терехова Ю.С. Биологически активные соединения, образуемые микроорганизмами- эндофитами, 2014, ж. Антибиотики и химиотерапия, т.59, № 5-6, с. 26-33.

5. Л. И. Домрачева, А. И. Фокина, С. Г. Скугорева, Т. Я. Ашихмина. Почвенные грибы рода *Fusarium* и их метаболиты: опасность для биоты, возможность использования в биотехнологии Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 1 2021.

РЕАНИМАЦИЯ КЛЕТОК ЛИОФИЛЬНО ВЫСУШЕННЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Пахомов Ю.Д., Блинкова Л.П.

НИИ Вакцин и Сывороток им. И.И. Мечникова. Москва

С тех пор, как в 1982 году впервые было обнаружено жизнеспособное,

но некультивируемое состояние (НС) у *Escherichia coli* и *Vibrio cholerae*, оно стало широко известным феноменом, который выявлен у микроорганизмов при попадании в стрессовые условия [1]. В этом состоянии клетки теряют способность к росту на обычной культуральной среде, но их метаболическая активность и способность к экспрессии генов сохраняются, а цитоплазматические мембраны остаются интактными [2]. Помимо патогенных и условно патогенных бактерий наличие жизнеспособных некультивируемых клеток (ЖНК) показано для лиофильно высушенных пробиотических микроорганизмов [3]. Реанимация является определяющим свойством клеток в НС, отличающим их от мёртвых клеток. Феномен реанимации бактерий из НС был впервые обнаружен у *Salmonella enteritidis* и *E. coli* в 1984 г. [4].

Цель работы. Проведение реанимации жизнеспособных некультивируемых клеток из лиофилизированных пробиотических препаратов.

Материалы и методы. В экспериментах использовали три вида пробиотических микроорганизмов в лиофилизированном состоянии: *E. coli* M-17, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, соответственно из коммерческих препаратов Колибактерин, Бифидумбактерин и Ацилол. В качестве сред для культивирования *E. coli* использовали триптический соевый бульон, а для остальных – среду Элликера. Обе среды использовались в виде полужидкого 0,7% агара. Для реанимации клеток применяли следующие среды с добавками:

1. Среда ДМЕМ.
2. Среда ДМЕМ + 10% бычьей фетальной сыворотки (БФС).
3. Среда ДМЕМ + 10% БФС после 2 дней культивирования клеток мышиной миеломы (ММ).
4. Среда RPMI 1640 + 10 μг/мл гентамицина + 5% БФС.
5. Среда RPMI 1640 + 10 μг/мл гентамицина + 5% БФС после 7 дней культивирования клеток СНО.
6. Кровезаменитель «Аминопептид» в дозах 1 и 10%.

Дозы каждой добавки составляли 1, 5 и 10 процентов от объёма. В качестве контроля использовались среды без добавок.

Для визуального обнаружения жизнеспособных и мертвых бактерий в образцах мы использовали набор Live/Dead (BacLight™) и люминесцентный микроскоп (Opton, увеличение 320). Культивируемость оценивали с помощью посева, метода наиболее вероятного числа, а также путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в пробирках с полужидким агаром. Для подсчета общего числа клеток использовали камеру Тома. Количество живых клеток в популяции оценивали путём умножения доли живых клеток на общее число бактерий в 1 мл.

Численность жизнеспособных, но некультивируемых клеток измеряли в результате сравнения общего количества жизнеспособных клеток и КОЕ/мл.

Результаты и обсуждение. Данные по рекультивации клеток пробиотических культур с помощью «Аминопептида» представлены в таблице 1. Для *E. coli* добавление 10 % «Аминопептида» приводило к увеличению числа выросших клеток в 6,45 раза ($p < 0,05$). Для *Lactobacillus acidophilus* культивируемость увеличилась в 5 раз ($p < 0,05$) на среде с 10% «Аминопептида». Для *B. bifidum* при добавлении 1% «Аминопептида» значение КОЕ/мл возросло в 2 раза ($p < 0,05$), а при добавлении 10% «Аминопептида» наблюдалось увеличение КОЕ/мл в 2,56 раза ($p < 0,05$). Следует отметить, что добавление «Аминопептида» заметно увеличивало скорость роста *Lactobacillus acidophilus*. В среде с добавкой колонии формировались в течение 48 часов, тогда как в контроле две трети колоний появлялись к 72 часам.

Таблица 1. Влияние «Аминопептида» на реанимацию жизнеспособных некультивируемых клеток.

Микроорганизм, (Препарат)	Реанимирующий фактор		Количественные характеристики		
			Контроль КОЕ/мл	Среда с фактором КОЕ/мл	Кратность изменения КОЕ/мл (значение p)
E. coli M–17 (Колибактерин, серия 40–3)	"Аминопептид" 10%		$6,2 \pm 0,68 \times 10^7$	$4 \pm 0,44 \times 10^8$	6,45 (< 0,05)
Lactobacillus acidophilus (Аципол, серия 11)			$2,2 \pm 2,42 \times 10^5$	$1,1 \pm 1,21 \times 10^6$	5 (< 0,05)
Bifidobacterium bifidum (Бифидумбактерин, серия 735)	"Аминопептид"	1%	$9 \pm 0,99 \times 10^5$	$1,81 \pm 0,2 \times 10^6$	2 (< 0,05)
		10 %	$9 \pm ,99 \times 10^5$	$2,3 \pm 0,25 \times 10^6$	2,56 (< 0,05)

Видно, что на добавление «Аминопептида» реагировали все пробиотические бактерии. Этот препарат является кровезаменителем, поэтому его химический состав близок к крови. Поскольку пробиотики попадают в кишечник человека или животного и адгезируются на его стенках, они взаимодействуют с жидкостями организма и затем реагируют на добавку. Таким образом, мы предполагаем, что даже если пробиотики могут содержать значительную часть некультивируемых клеток (особенно у лактобацилл), эффект таких препаратов может усиливаться, когда ЖНК оживают после приема внутрь. Для многих видов бактерий уже показана реанимация при прохождении через организм хозяина [5]. Для *B. bifidum* выявлено 6,4 х 108 клеток/мл, из которых

82,82% жизнеспособны. 99,96% были ЖНК. В зависимости от добавки и ее концентрации число КОЕ/мл увеличивалось в 1,4 – 4,35 раза. Наиболее эффективное оживление бактерий наблюдали при 5% добавки 1 и 1% добавки 5 (табл. 2). Для *Lactobacillus acidophilus* наибольшая стимуляция наблюдалась для 5 и 10% добавки 1. В опыте культивируемость пробиотических клеток увеличилась в 12,5 и 12,0 раз. Для добавок 2–5 был достигнут слабый стимулирующий эффект (табл. 3). Цифры КОЕ/мл увеличились в 1,72–2,78 раза. Для среды RPMI-1640 мы наблюдали противоположные эффект при наличии гентамицина (более сильное ингибирование при более высокой дозе) и БФС с культуральной жидкостью (стимуляция роста колоний). Для культуральной жидкости от СНО стимуляция была в 2-4 раза, а для ММ – в 2-3 раза в зависимости от концентрации и рода бактерий. В некоторых случаях отмечалась ингибиция.

Таблица 2. Влияние сред и культуральных жидкостей на *Bifidobacterium bifidum*.

Добавка к среде	Доза добавки, КОЕ/мл и кратность изменений по сравнению с контролем		
	1%	5%	10%
Среда ДМЕМ.	5,4 ± 0,59 (2,7) p < 0,05	8,7 ± 0,96 (4,35) p < 0,05	7,4 ± 0,81 (3,7) p < 0,05
Среда ДМЕМ + 10% БФС.	5,1 ± 0,56 (2,55) p < 0,05	7,4 ± 0,81 (3,7) p < 0,05	4,3 ± 0,47 (2,15) p < 0,05
Среда ДМЕМ + 10% БФС после 2 дней культивирования клеток ММ	6,4 ± 0,70 (3,2) p < 0,05	5,7 ± 0,63 (2,85) p < 0,05	7,2 ± 0,79 (3,6) p < 0,05
Среда RPMI 1640 + 10 μг/мл гентамицина + 5% БФС	2,8 ± 0,31 (1,4) p < 0,05	4,1 ± 0,45 (2,05) p < 0,05	0,87 ± 0,096 (0,44) p < 0,05
Среда RPMI 1640 + 10 μг/мл гентамицина + 5% БФС после 7 дней культивирования СНО	8,2 ± 0,90 (4,1) p < 0,05	3,7 ± 0,41 (1,85) p < 0,05	4,0 ± 0,44 (2,0) p < 0,05
Контроль (без добавок)		2,0 ± 0,22	

Таблица 3. Влияние сред и культуральных жидкостей на *Lactobacillus acidophilus*.

Добавка к среде	Доза добавки, КОЕ/мл и кратность изменений по сравнению с контролем		
	1%	5%	10%
Среда ДМЕМ.	24 ± 2,64 (4,05) p < 0,05	73 ± 8,03 (12,5) p < 0,05	70 ± 7,7 (12,07) p < 0,05
Среда ДМЕМ + 10% БФС	16 ± 1,76 (2,78) p < 0,05	14 ± 1,54 (2,40) p < 0,05	10 ± 1,1 (1,72) p < 0,05
Среда ДМЕМ + 10% БФС после 2 дней культивирования ММ	12 ± 1,32 (2,07) p < 0,05	16 ± 1,76 (2,76) p < 0,05	13 ± 1,43 (2,24) p < 0,05
Среда RPMI 1640 + 10 μг/мл гентамицина + 5% БФС	10 ± 1,1 (1,72) p < 0,05	2,0 ± ,22 (0,34) p < 0,05	0,1 ± 0,011 (0,02) p < 0,05
RPMI 1640 + 10 мг/мл гентамицина +5% БФС; 7 дней культивирования СНО	13 ± 1,43 (2,17) p < 0,05	6,0 ± 0,66 (1,03) p > 0,05	5,0 ± 0,55 (0,86) p > 0,05
Контроль (без добавок)	5,8±0,64		

Для препарата *E. coli* (общее количество клеток: 1,63 1010 клеток/мл, 71,43% жизнеспособных клеток) в пробирках с бактериальной питательной средой была равномерно мутная без отдельных колоний. Однако мы смогли оценить относительную метаболическую активность, сравнив количество газа в полужидкой среде. В контроле рост бактерий из ряда десятикратных разведений наблюдался в пробирках 1-8 (около 99% клеток ЖНК), и количество газа было наименьшим в этом эксперименте. В большинстве сред с добавками *E. coli* демонстрировала интенсивную газопродукцию. Самый сильный реанимационный эффект наблюдался для 10% и 1% добавки 4. В этих вариантах рост наблюдался до 10-го разведения. Добавка № 3 оказалась подавляющей газообразование по сравнению с 1 и 2.

Роль жизнеспособных некультивируемых бактерий еще недостаточно изучена во многих областях микробиологии. Исследования по этой проблеме могут существенно расширить представления о поведении санитарно значимых микроорганизмов, причинах и проявлениях дисбиотических состояний, помочь точнее охарактеризовать патогенные агенты и улучшить оценку жизнеспособности клеток в пробиотических препаратах, применяемых для коррекции дисбиозов.

Заключение. Нами был проведен поиск факторов, способствующих реанимации из некультивируемого состояния обратно в активное.

Добавки, которые были близки к химическому составу тканей хозяина или содержали метаболиты, аналогичные метаболитам макроорганизма, демонстрируют потенциал для реанимации жизнеспособных некультивируемых клеток пробиотических бактерий.

Список литературы

1. Dong, K.; Pan, H.; Yang, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 2020, 19, 149–183.

2. Oliver, J.D. The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol., 2005, 43, 93–100.

3. Blinkova L.P., Martirosyan D., Pakhomov Yu., Dmitrieva O., Vaughan R., Altshuler M. Nonculturable forms of bacteria in lyophilized probiotic preparations. Functional Foods in Health and Disease, 2014; V. 4(2):66-76

4. Roszak, D.B.; Grimes, D.J.; Colwell, R.R. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol., 1984, 30, 334–338.

5. Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., Andrews, S. Viable but nonculturable bacteria: Food safety and public health perspective. ISRN Microbiology, 2013. article ID703813 https://doi.org/10.1155/2013/703813.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ РАЗНЫХ МОРФОСТРУКТУР БАЗИДИОМИЦЕТА *LENTINULA EDODES* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С СИНТЕЗОМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Ветчинкина Е.П.[1], Горшков В.Ю.[2]
[1]Саратовский научный центр РАН
[2]Казанский научный центр РАН

Базидиомицеты продуцируют большое количество биологически активных и лекарственных веществ, широко применяемых в медицине и фармацевтике [1]. Внимание привлекают исследования посвященные поиску грибных молекул, обладающих антибиотическими, антиоксидантными, противовирусными, противовоспалительными, иммуностимулирующими, гепатопротекторными свойствами [2, 3]. Перспективным в этом плане является базидиомицет *Lentinula edodes*, который ценится как съедобный и лекарственный макромицет [4–6]. В качестве ценного сырья используют плодовые тела грибов, гораздо меньше изучены вторичные метаболиты вегетативного мицелия

и других морфоструктур, состав которых по содержанию биологически активных веществ, может качественно превосходить состав плодовых тел [7]. В основном биологически активные соединения представлены высокомолекулярными -глюканами или -глюканами, связанными с белками [8, 9]. Однако, помимо полисахаридов, грибы производят огромное количество молекул, которые могут не только стимулировать иммунную систему, но также модулировать специфические клеточные реакции. Интерес представляют вторичные метаболиты, низкомолекулярные соединения, такие как антибиотики, фенолоксидазы, лектины, пигменты, хелатирующие агенты и др. Проникая через клеточную мембрану, они способны модулировать различные внутриклеточные пути, и представляют собой новые многообещающие инструменты для терапии большого спектра заболеваний [7, 10]. С помощью методов высокопроизводительного секвенирования можно проводить исследования транскриптомов организмов и получать информацию о профиле экспрессии всех генов для масштабной характеристики метаболизма. Нами был разработан алгоритм профилирования транскриптомов немодельных организмов на примере *L. edodes*, что позволило провести сравнительный анализ разных стадий онтогенеза гриба, в том числе для характеристики метаболических путей и функциональных категорий, ответственных за синтез и функционирование биологически активных низкомолекулярных соединений, с потенциалом применения в медицине и фармацевтике [11].

Цель исследования – транскриптомный анализ разных морфоструктур *Lentinula edodes* и классификация дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), входящих в функциональные категории и метаболические пути, связанные с синтезом биологически активных соединений медицинского назначения.

Материалы и методы исследования. В работе использовали базидиомицет *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (шиитаке). Для прохождения всех стадий онтогенеза культуру выращивали интенсивным способом на древесном субстрате. Выделение РНК из *L. edodes* проводили с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Москва) согласно протоколу производителя на четырех стадиях онтогенеза – непигментированного мицелия (НМ), коричневой мицелиальной пленки (КМП), примордиев (ПР) и плодовых тел (ПТ). Определение нуклеотидных последовательностей библиотек кДНК проводили на платформе Illumina HiSeq 2500 (США). Контроль качества ридов (прочтений), полученных в ходе секвенирования, проводили с помощью программ FastQC, Trimmomatic, SortMeRNA и Trim Galore. Для сборки транскриптов использовали программу Trinity, для проверки качества сборки транскрипты сопоставляли с ортологичными генами базидиомицетов (http://www.orthodb.org/) с помощью программы

BUSCO. Аннотацию собранных транскриптов осуществляли с помощью программы BLAST+ относительно белковых последовательностей, описанных для других макромицетов. Сборная аннотация по гомологии со всеми известными белками была проведена с использованием баз данных GenBank NR RefSeq и UniRef. Дополнительная аннотация была основана на поиске доменов и консервативных мотивов в транскрипте с помощью баз данных Conserved Domains Database (CDD) и InterPro. Для классификации по метаболическим путям ДЭГ *L. edodes* и визуализации активируемых/репрессируемых метаболических путей использовали базу данных Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) и Eukaryotic Orthology Groups (KOG) families и проводили с помощью авторского скрипта (https://github.com/RimGubaev/deg_to_path). Для статистической обработки полученных данных и оценки ДЭГ использовались различные R-пакеты из Bioconductor (EdgeR, DESeq, DEXSeq).

Результаты и обсуждение. Классификация ДЭГ макромицета *L. edodes* на стадиях НМ, КМП, ПР и ПТ по функциональным категориям была проведена с использованием баз данных KEGG и KOG. Анализ транскритомных профилей на разных стадиях онтогенеза выявил ДЭГ, установлено, что в КМП по сравнению с НМ дифференциально экспрессируются 10216 генов; при этом экспрессия 5166 генов активируется, а 5050 – репрессируется. На генеративных стадиях развития относительно НМ ДЭГ – в ПР – 5395 (активируется – 2775, репрессируется – 2620); в ПТ – 11201 (активируется – 5567, репрессируется – 5634).

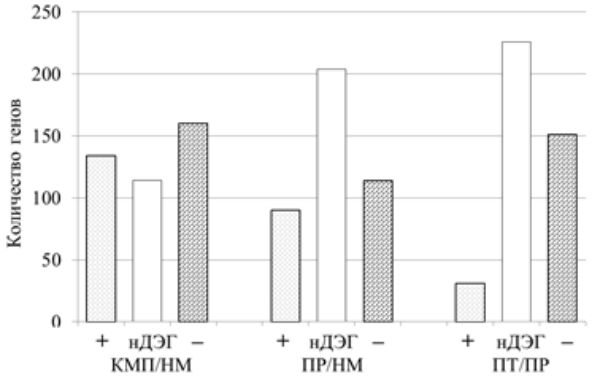


Рис.1. Сравнительный анализ транскриптомов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* для выявления ДЭГ, входящих в функциональную категорию биосинтез вторичных метаболитов с использованием базы данных KOG. НМ – непигментированный мицелий, КМП – коричневая мицелиальная пленка, ПР – примордии и ПТ – плодовое

тело; «+» – активируемые гены, «–» – репрессируемые гены, нДЭГ – дифференциально неэкспрессирующиеся гены.

С помощью базы данных KOG мы обнаружили, что в НМ по сравнению с КМП активируются пути, ответственные за синтез вторичных метаболитов, всего обнаружено 408 генов в данной категории, 160 ДЭГ активируются, 134 ДЭГ находятся в репрессии, 114 генов нДЭГ. В ПР относительно НМ большинство генов (204 гена) вторичных метаболитов нДЭГ, активируются – 90 ДЭГ, репрессируются – 114 ДЭГ. В ПТ в сравнении с ПР обнаружено наименьшее количество активируемых ДЭГ – 31 ген, большинство в ПТ (226) нДЭГ, в репрессии находятся 151 ДЭГ. Таким образом, можно отметить, что наибольшее количество активируемых генов в данной категории находится в НМ и КМП (Рис. 1).

Помимо функциональной классификации ДЭГ *L. edodes* с применением базы данных KOG, информация была дополнена с помощью ресурса KEGG. Было установлено, что функциональная категория биосинтез вторичных метаболитов представлена 296 генам, из которых 157 ДЭГ на стадии КМП относительно НМ, 99 ДЭГ в ПР относительно НМ и 62 ДЭГ в ПТ в сравнении с ПР. К метаболической группе генов, ответственных за синтез антибиотиков, отнесено в общей сложности 218 генов, наибольшее количество ДЭГ (114) выявлено на стадии КМП, в соотношении ПР/НМ 75 нДЭГ, в ПТ относительно ПР выявлено 49 ДЭГ. С помощью информации базы данных KEGG в функциональной категории биосинтез вторичных метаболитов было обнаружено 207 аннотированных генов. Наибольшее количество ДЭГ было представлено в паре сравнения КМП/НМ, из них 89 активируемых и 68 репрессируемых генов, 50 нДЭГ. В ПР относительно НМ количество нДЭГ увеличивается вдвое до 106 генов, активируемых – 65 репрессируемых генов – 36. В базидиомах ПТ/ПР большинство генов (147) нДЭГ, обнаружено в ПТ 26 активируемых и 34 репрессируемых генов. Наибольшее количество активных генов, ответственных за синтез вторичных метаболитов представленных в базе данных KEGG находится в КМП, также высокое содержание активируемых генов отмечено в НМ и ПР (Рис.2).

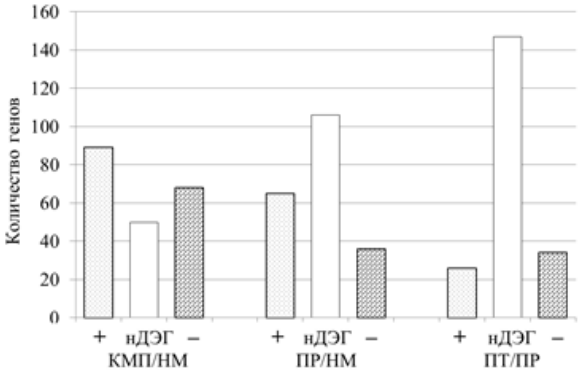


Рис. 2. Сравнительный анализ транскриптомов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* для выявления ДЭГ, входящих в функциональную категорию биосинтез вторичных метаболитов с использованием базы данных KEGG. Обозначения аналогичны 1 рисунку.

Классификация категорий генов ответственных за синтез антибиотиков, представленных в базе данных KEGG, выявила 154 гена на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* в данном метаболическом пути. Было установлено, что соотношение ДЭГ/нДЭГ при сравнении КМП и НМ составляет 117/37, активируемых генов – 67, репрессируемых – 50 генов. При сравнении ПР и НМ количество нДЭГ (81) превышает ДЭГ (73), из них активируемых – 48 генов, репрессируемых – 25 генов. В ПТ относительно ПР обнаружено 27 активируемых и 19 репрессируемых генов, соотношение ДЭГ/нДЭГ составляет 46/108, наблюдается большое количество генов с одинаковой экспрессией, что говорит о схожести этих морфоструктур в отношении синтеза антибиотиков, наибольшая активность генов в данной функциональной категории отмечена на стадии КМП (Рис. 3).

В последнее время лектины рассматриваются как новые инструменты для диагностики и терапии различных заболеваний, в частности рака. Способность лектинов распознавать лиганды гликозильного происхождения и обратимо связываться с углеводами позволяет этим гликопротеинам распознавать аберрантно гликозилированные клеточные мембраны злокачественных опухолей [12, 13]. Кроме того, лектины обладают противоопухолевой активностью, приводящей к индукции запрограммированной клеточной гибели в раковых клетках, а также способны стимулировать аутофагию в клетках, посредством которой, клеточные фрагменты разрушаются в лизосомах [14, 15]. Сравнительный анализ

транскриптомов на разных стадиях онтогенеза *L. edodes*, выявил большое количество ДЭГ, кодирующих лектины, что объясняется широким разнообразием функций и процессов, регулируемых данными гликопротеинами.

В мицелии и базидиомах лекарственных макромицетов содержится большое количество фенолокисляющих ферментов, таких как лакказы и различные пероксидазы. Было показано, что ферментная терапия играет важную роль в лечении рака, предотвращая окислительный стресс и подавляя рост клеток [16]. Сравнительный анализ транскриптомов и характеристика ДЭГ фенолокисляющих ферментов показал наличие активацию/репрессию генов данной функциональной категории на всех стадиях онтогенеза *L. edodes*. В КМП обнаружено 12 активируемых и 9 репрессируемых генов, в ПР – 7 активируемых и 9 репрессируемых генов относительно НМ. В ПТ по сравнению с ПР 4 – активируемых и 7 репрессируемых генов. Соотношение ДЭГ/нДЭГ в КМП и ПР относительно НМ и в ПТ относительно ПР составило 21/17, 16/22 и 11/27, соответственно.

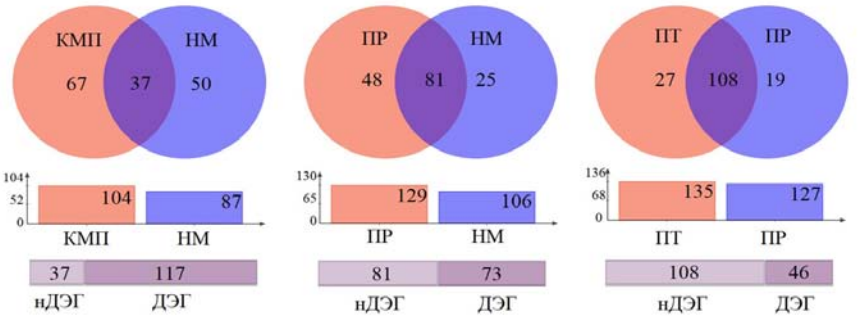


Рис. 3. Сравнительный анализ транскриптомов (представленный в диаграммах Венна) на разных стадиях онтогенеза *L. edodes* для выявления ДЭГ, входящих в функциональную категорию биосинтез антибиотиков с использованием базы данных KEGG. Обозначения аналогичны 1 и 2 рисункам.

Наряду с другими вторичными грибными метаболитами, показано что, меланиновые пигменты обладают противовоспалительной, высокой антиоксидантной и антирадикальной активностью, оказывают иммуномодулирующее, фотопротекторное и антимутагенное действие [17]. Нами были обнаружены ДЭГ в категории меланогенез, наибольшее количество активированных ДЭГ наблюдается в КМП по отношению к НМ. В ПР также большинство генов данной категории

было активировано, в ПТ по отношению к ПР активированных ДЭГ не наблюдалось, часть генов находилась в репрессии, большинство же генов меланогенеза дифференциально не экспрессировалось.

Современные фармацевтические тенденции в профилактике и терапии различных заболеваний включают разработку новых диагностических тест-систем и лекарств на основе вторичных грибных метаболитов. Успех применения данных лекарственных препаратов требуют всестороннего изучения низкомолекулярных соединений, продуцируемых лекарственными базидиомицетами.

Список литературы

1. Lindequist U. The merit of medicinal mushrooms from a pharmaceutical point of view // Int. J. Med. Mushr. 2013. V. 15. P. 517–523.

2. Xu Z., Chen X., Zhong Z. et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities // Amer. J. Chin. Med. 2011. V. 39. P. 15–27.

3. Bisen P.S., Baghel R.K., Sanodiya B.S., et al. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities // Curr. Med. Chem. 2010. V. 17. P. 2419–2430.

4. Chen H., Ju Y., Li J. Antioxidant activities of polysaccharides from *Lentinus edodes* and their significance for disease prevention // Int. J. Biol. Macromol. 2012. V. 50. P. 214–218.

5. Xu X.F., Yan H.D., Tang J., et al. Polysaccharides in *Lentinus edodes*: isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2014. V. 54. P. 474–487.

6. Ya G. A *Lentinus edodes* polysaccharide induces mitochondrial-mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 103. P. 676–682.

7. Wasser S.P. Medicinal Mushroom Science: Current Perspectives, Advances, Evidences, and Challenges // Biomed. J. 2014. V. 37. P. 345–356.

8. Chen J., Seviour R. Medicinal importance of fungal –(1–3), (1–6)-glucans // Mycol. Res. 2007. V.111. P. 635–652.

9. Wang Y., Han X., Li Y.D., et al. Lentinan dose dependence between immunoprophylaxis and promotion of the murine liver cancer // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 95152–95162.

10. Anke T. Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites // Prog. Ind. Microbiol. 1989. V. 27. P. 51–66.

11. Gubaev R.F., Gorshkov V.Yu., Gapa L.M., Gogoleva N.E., Vetchinkina E.P., Gogolev Yu.V. Algorithm for physiological interpretation of transcriptome profiling data for non-model organisms // Mol. Biol. 2018. V. 52. P. 497–509.

12. Chernikov O., Kuzmich A., Chikalovets I., et al. Kuo-Feng hua, lectin

CGL from the sea mussel Crenomytilus grayanus induces Burkitt's lym*phoma* cells death via interaction with surface glycan // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 104. P. 508–514.

13. Li J., King M.R. Adhesion receptors as therapeutic targets for circulating tumor cells // Front. Oncol. 2012. V. 2. P. 79.

14. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K., et al. Antitumour activity of cytotoxic liposomes equipped with selectin ligand SiaLe(X), in a mouse mammary adenocarcinoma model // Eur. J. Cancer. 2000. V. 36. P. 942–949.

15. Li W.W., Yu J.Y., Xu H.L., Bao J.K. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 414. P. 282–286.

16. Wasser S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems // Int. J. Med. Mushr. 2010. V. 12. P. 1–16.

17. Marcovici I., Coricovac D., Pinzaru I., et al. Melanin and Melanin-Functionalized Nanoparticles as Promising Tools in Cancer Research-A Review // Cancers (Basel). 2022. V.14, №7. P. 1838.

ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ШТАММОМ ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS* BDU-12

Зейналова Л.А., Керимова Л.А.
Бакинский Государственный Университет, Азербайджан

Во многих развитых странах широкомасштабный синтез металлических наночастиц осуществляется с использованием физических, химических и биологических методов.

В последнее время особое внимание уделяется использованию биологических методов при синтезе наночастиц. Основываясь на процессе биологического синтеза наноструктур, существует 3 основных условия - использование растворителей среднего размера для синтеза, выбор экологически чистых агентов и выбор нетоксичных материалов для стабилизации наночастиц. Использование биологических объектов при синтезе наночастиц позволяет увеличить биомассу и размер получаемой наночастицы. Особое внимание в этом процессе уделяется применению бактерий и микросокпических грибов.

Основной целью представленной работы является изучение способности *Pleurotus ostreatus* образовывать наночастицы серебра. Эти грибы также используются в качестве пищевых продуктов. В то же время они синтезируют ферменты с широким спектром хищных

грибов. Они могут парализовать нематоды в результате летального воздействия.

Штамм *Pleurotus ostreatus* BDU-12 были взят из коллекции культур кафедры микробиологии Бакинского Государственного Университета. Культивирование гриба проводили на среде, которая содержит глюкозу, пептон, NH4NO3, NaCl, MgSO4, KH2PO4. Инкубация проводилась в течение 7-14 дней. Биомасса была отделена фильтрацией. Извлеченную биомассу трижды промывали 100 мл стерильной дистиллированной воды. Затем добавляли 10-3 AgNO3 на 100 мл жидкости и помещали в термостат. С 10-го дня инкубации цвет реакционных смесей, хранящихся в термостате, начал заметно меняться от светло-желтого до темно-коричневого. Затем проводили спектрофотометрический анализ. Спектры поглощения 400–450 нм наблюдали на спектрофотометре UV – V S. Это поглощение характерно для частиц наночастиц серебра. Это, в свою очередь, подтверждает, что гриб *Pleurotus ostreatus* синтезирует наночастицы серебра.

РАЗНОСТНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОЛИАМИНОВ ВЫЯВЛЯЕТ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ БИОСИНТЕЗА ЦЕФАЛОСПОРИНА С У *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*

Жгун А.А., Нураева Г.К., Хомутов М.А., Хомутов А.Р.
ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

В начале 2010-х было показано, что экзогенное введение алифатических полиаминов способно дополнительно повышать продукцию целевых вторичных метаболитов у ряда важнейших грибных продуцентов (таких как, продуцент пенициллина G *Penicillium chrysogenum* или продуцент ловастатина *Aspergillus terreus*), улучшенных классическими методами (classical strain improvement, CSI). Однако молекулярные основы этого феномена до сих пор неизвестны.

Объектами нашего исследования явились штаммы сордариомицета *Acremonium chrysogenum*, дикого типа WT (ATCC 11550) и его улучшенный классическими методами аналог HY (RNCM 408D), с увеличенным в 200–300 раз уровнем продукции антибиотика цефалоспорина С (цефС). *A. chrysogenum* является эксклюзивным промышленным продуцентом цефС, который служит сырьем для последующего синтеза in vitro цефалоспориновых антибиотиков

1–5 поколений. Биосинтез цефС у *A. chrysogenum* осуществляется за счет функционирования двух кластеров биосинтетических генов (biosynthetic gene clusters, BGC), в которые входят соответственно так называемые «ранние» и «поздние» гены биосинтеза, транспорта и регуляции бета-лактамов. собраны. Эти кластеры расположены на разных хромосомах (у штаммов дикого типа «ранний» BGC локализован на хромосоме VI, а «поздний» BGC локализован на хромосоме I) и координированно регулируются. «Ранний» BGC бета-лактамов содержат гены биосинтеза «ранней» (pcbAB, pcbC) и «средней» (cefD1, cefD2) стадий биосинтеза, а также гены транспорта интермедиатов через клеточные компартменты (cefP, cefM и cefT) и cefR для путь-специфичного регулятора. «Поздний» BGC бета-лактамов содержат гены финальных стадий биосинтеза цефС (cefEF и cefG).

В предыдущих экспериментах штамм *A. chrysogenum* HY проявлял неожиданно высокую устойчивость к ингибиторам ключевого фермента биосинтеза полиаминов, орнитиндекарбоксилазе (ODC), таким как -дифторметилорнитин (DFMO или эфлорнитин) и APA (1-аминоокси-3-аминопропан), которые специфически убивали *A. chrysogenum* WT, но не ослабленный в результате многораундового мутагенеза *A. chrysogenum* HY [1]. Также установили, что при ферментации *A. chrysogenum* HY содержание ПА (спермидин, спермин) увеличивалось в 4–5 раз по сравнению с *A. chrysogenum* WT [1]. Введение экзогенных ПА, таких как спермидин или 1,3-диаминопропан (1,3-ДАП), приводило к увеличению прорастания и размера колоний штамма *A. chrysogenum* HY на комплексной агаризованной (CPA) среде [2]. Также показали, что добавление 5 мМ ПА при глубинной ферментации на комплексной (CP) среде увеличивает продукцию цефС в *A. chrysogenum* HY на 15–20% и апрегулирует биосинтетические гены из бета-лактамных BGCs [2]. Данные, полученные для *A. chrysogenum* HY: (i) повышение устойчивости к ингибиторам биосинтеза ПА, (ii) сдвиг гомеостаза ПА, выражающийся в увеличении их клеточного содержания, (iii) увеличение продукции цефС при экзогенном введении ПА – указывают на пересечение биосинтеза цефС и метаболизма ПА. Однако уровни, на которых происходит пересечение этих путей метаболизма, неизвестны. В то же время понимание молекулярных основ повышения продукции под действием ПА чрезвычайно важно для правильной стратегии культивирования грибов-продуцентов, поскольку было показано, что экзогенные ПА могут как повышать, так и снижать уровень целевых СМ [3]. Имеющиеся данные о

влиянии ПА на продукцию цефС у *A. chrysogenum* HY были получены на комплексной среде CP, с неопределенным набором питательных веществ, где невозможно выявить роль отдельных компонентов и которая сама содержит определенное количество ПА.

В связи с этим целью нашей работы было изучение влияния ПА на продукцию цефС на синтетической среде с определенными и специально подобранными компонентами. Важно, чтобы такая синтетическая (SN) среда, с одной стороны, содержала четкое и ограниченное количество питательных веществ, а с другой стороны, обеспечивала необходимые условия для роста и высокой продукции цефС у *A. chrysogenum*. Оказалось, что 1,3-ДАП и спермидин по-разному воздействуют на такой среде; добавление 1,3-ДАП приводили к увеличению продукции цефС, а добавление спермидина, наоборот, снижало ее. В то же время при добавлении спермидина (но не 1,3- ДАП) происходило накопление предшественника пути биосинтеза цефС, деацетилцефалоспорина С (дцефС). В результате общее количество цефемов (дцефС и цефС) при добавлении обоих ПА оказалось очень близким и на 12–15 % выше, чем в контроле. Это указывает на то, что на среде SN добавление SPD, а не 1,3-DAP, избирательно влияет на последнюю лимитирующую стадию биосинтеза цефС [43].

Чтобы понять молекулярную основу этого явления, мы исследовали экспрессию генов биосинтеза и транспорта бета-лактамов при ферментации на среде SN после добавления 1,3-ДАП, спремидина и без добавок (контроль). Однако при этом не наблюдалось существенных отличий; добавление обоих ПА приводило к сходному воздействию по сравнению с контролем. Важно отметить, что не было существенной разницы в уровне экспрессии гена cefG, продукт которого, деацетилцефалоспорин-С-ацетилтрансфераза (CefG, EC: 2.3.1.175), превращает дцефС в цефС [4]. Поскольку для функционирования CefG также необходим ацетил-КоА, противоположное действие ПА могло быть связано с тем, что ацетил-КоА расходуется для катаболизма спремидина, но не а не 1,3-ДАП (для которого реакция N1-ацетилирования протекает на несколько порядков хуже) [4]. Добавление цефС в относительно бедную питательными веществами среду SN истощает пул ацетил-КоА, что приводит к накоплению дцефС. Таким образом впервые показали взаимосвязь между биосинтезом цефалоспорина С и метаболизмом полиаминов на уровне общего субстрата, ацетилкофермента А. Такие знания важны как для понимания молекулярных основ действия полиаминов на высокопродуктивные штаммы грибов, так и для целенаправленного создания штаммов

и подбора питательных сред для повышения продукции целевых вторичных метаболитов.

Список литературы

1. Hyv nen M.T. et al. Hydroxylamine analogue of agmatine: Magic bullet for arginine decarboxylase // Biomolecules. MDPI AG, 2020. Vol. 10, № 3. P. 406.

2. Zhgun A.A., Eldarov M.A. Polyamines Upregulate Cephalosporin C Production and Expression of -Lactam Biosynthetic Genes in High-Yielding *Acremonium chrysogenum* Strain // Mol. 2021, Vol. 26, Page 6636. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 26, № 21. P. 6636.

3. Zhgun A.A., Nuraeva G.K., Eldarov M.A. The Role of LaeA and LovE Regulators in Lovastatin Biosynthesis with Exogenous Polyamines in *Aspergillus terreus* // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. Vol. 55, № 6. P. 639–648.

4. Zhgun A.A., Eldarov M.A. Spermidine and 1,3-Diaminopropane Have Opposite Effects on the Final Stage of Cephalosporin C Biosynthesis in High-Yielding *Acremonium chrysogenum* Strain // Int. J. Mol. Sci. MDPI, 2022. Vol. 23, № 23. P. 14625.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗЫ ГРИБАМИ РОДА *ASPERGILLUS*

Жуковская Л.А., Семашко Т.В.
Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Холестеролоксидаза (ХО) (КФ 1.1.3.6.) – фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, который катализирует окисление и изомеризацию холестерина с образованием пероксида водорода. ХО широко используется в клинической диагностике для определения уровня холестерина в крови и других биологических жидкостях, для производства предшественников стероидных гормонов, а также может применяться в качестве инсектицидного и антимикробного средства [1, 2].

Ранее нами при помощи чашечного тест-метода был проведен поиск мицелиальных грибов, продуцирующих ХО, и отобраны наиболее активные штаммы [3], среди них грибы рода *Aspergillus* (*A. alliaceus* 35, *A. alliaceus* 764, *A. niger*).

Цель исследования – проанализировать влияние условий культивирования на рост и образование ХО грибами рода *Aspergillus*.

Известно, что источники углерода в значительной степени оказывают влияние на рост и образование вторичных метаболитов грибами [4].

Установлено, что добавление 5,0% мелассы приводило к максимальному количеству образования ХО у штамма *A. aliaceus* 764 (0,08 ед/мл). Такое же количество мелассы стимулировало и накопление количества биомассы грибом (13,67 мг/мл). Наличие глицерина в питательной среде подавляло продукцию ХО этим штаммом. Наиболее эффективным для продукции ХО *A. aliaceus* 35 являлось добавление в питательную среду 2,5% мелассы. (0,076 ед/мл). При добавлении глицерина во всех исследуемых концентрациях значение ХО снижалось в 3,8-19,0 раз. Присутствие мелассы снижало уровень образования ХО *A. niger* на 23,6 – 38,2%, однако способствовало приросту биомассы на 23,9 – 51,0%. Наличие в питательной среде глицерина не влияло на уровень образования ХО *A. niger*, но приводило к снижению количества биомассы на 46,2 – 61,2%.

Анализ влияния значения начального pH питательной среды (6,0 – 10,0) на рост исследуемых грибов показал, что количество накопленной биомассы по окончании культивирования находилось в диапазоне 6,15 – 13,24 мг/мл. Лучшие условия для роста *A. alliaceus* 35 создаются при начальном pH 7,0 (8,65 мг/мл биомассы), *A. alliaceus* 764 при pH 9,0 (13,24 мг/мл), а *A. niger* при pH 8,0 (11,82 мг/мл). Оптимальным значением начального pH питательной среды для образования ХО исследуемыми грибами был 9,0 (*A. alliaceus* 35 – 0,043 ед/мл, *A. alliaceus* 764 – 0,044 ед/мл, *A. niger* – 0,055 ед/мл). Следует отметить, что у *A. alliaceus* 764 оптимальное значение начального pH для роста совпадает с оптимальным значением pH для образования внеклеточной ХО данным грибом.

При изучении влияния температуры культивирования (24–30 °C) на рост и образование ХО исследуемыми штаммами установлено, что лучшие показатели достигаются при культивировании данных грибов при 26 °C. Снижение или повышение температуры культивирования на 2 °C приводило к снижению уровня образования ХО на 5,9 24,1 %, а при дальнейшем изменении температурного режима в ту или другую сторону происходило еще большее снижение уровня образования ХО.

Таким образом, показана возможность использования мелассы и глицерина в качестве дополнительных источников углерода для роста и образования ХО грибами рода *Aspergillus*, установлены оптимальные значения начального pH питательных сред и

температуры культивирования.

Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ Б21АРМ-021.

Список литературы

1. Kapoor, L. Cholesterol oxidase and its applications / L. Kapoor, S. Kanwar // Adv. Microbiol. – 2012. – Vol. 2 – P. 49-65.

2. Noriyuki, D. Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases / D. Noriyuki // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 83. – P. 825-837.

3. Zhukouskaya, L.A. Fungi as potential producers of cholesterol oxidases/ L.A. Zhukouskaya, T.V. Semashko, M.V. Muntsianava // National scientific symposium with international participation: Modern biotechnologies – solutions to the challenges of the contemporary world, Moldova, Chisinau 2021, May 20-21 (online). – P. 162.

4. Михайлова, Р.В. Зависимость биосинтеза внеклеточной глюкозооксидазы Peniillium varians от углеродсодержащих компонентов питательной среды / Р.В. Михайлова, Ж.Ф. Циркунова, А.Г. Лобанок, Е.В. Шахнович // Весці Нац. Акад. навук Беларусі. Сер. біял.навук. – 2014. – № 1. – Р. 84-88.

Глава 15

НОВЫЕ АНТИБИОТИКИ, АНТИМИКОТИКИ И ФУНГИЦИДЫ

DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.15

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА И ЭФИРНОГО МАСЛА ЭСТРАГОНА

(*ARTEMISIA DRACUNCULUS* **L.**)

Адамян Р.Г., Погосян А.В., Элоян И.М., Закарян Н.А., Нанагюлян С.Г.

Ереванский государственный университет, Армения

Лекарственные и съедобные растения являются важным, а иногда и единственным, источником биологически активных соединений (БАС). Исследования многих ученых доказывают, что даже наименьшая концентрация БАС (эфирные масла, сапонины, флаваноиды и т.д.) отрицательно воздействует на развитие патогенных грибов, что позволяет использовать растительные ресурсы, как эффективное сырье для создания лекарственных препаратов [1]. Следовательно, разработка отечественных иммунотропных лекарственных средств растительного происхождения, фармакологическая эффективность которых сочетает в себе, как благоприятное воздействие на иммунную систему организма, так и ингибирующее воздействие на инфекционный агент (вирусы, патогенные бактерии, грибы) является весьма актуальной [2].

Ряд исследований эфирного масла и экстрактов различных видов рода *Artemisia* выявили высокую антимикробную, антивиральную и антифунгальную активности, что применяется в фармации, с целью разработки новых лекарственных препаратов [3; 4; 5]. Учитывая высокую биологическую активность и широкое применение экстрагона (*Artemisia dracunculus* L., сем. *Asteraceae*) в Армении как съедобного растения, нами были проведены исследования по выявлению антифунгальной активности его водного экстракта и эфирного масла.

Эфирное масло было предоставлено фирмой Наирян , производящей натуральные косметические и лечебные средства по уходу за кожей лица и тела. Антифунгальная активность эфирного масла и экстракта листьев (1:10) полыни эстрагонной оценивалась диско-диффузным методом, основанным на феномене густого роста микромицетов [6; 7]. Данный метод позволяет отнести микроорганизмы к чувствительным, при зоне ингибиции ≥ 14мм и устойчивым, при зоне ингибиции ≤ 14 мм.

Исследования проводились по отношению к широко распространенным, условно патогенным микроскопическим грибам: *Aspergillus niger* Tiegh, *Penicillium italicum* Wehmer, *Rhizopus oryzae* Went & Prinsen Geerligs. Штаммы были взяты из коллекции чистых культур кафедры ботаники и микологии ЕГУ. Цитологические

препараты исследовались на микроскопе VWR.

Так, пропитанные исследуемыми ингибиторами бумажные диски укладывались на поверхность питательной среды, зараженными штаммами грибов. В результате опыта, с одной стороны наблюдался рост микромицетов на питательной среде, с другой - диффузия ингибитора. Через 18-20 часов измерялись диаметры зон задержки роста вокруг дисков. Антифунгальная активность экстракта и эфирного масла наблюдалась в течение 5 дней.

Во всех чашках на начальном этапе наблюдалось ингибирование роста 3 видов грибов - *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Rhizopus oryzae*.

Наибольшую антифунгальную активность экстракт листьев эстрагона и его эфирное масло проявили по отношению к виду *Penicillium italicum*, где зона ингибиции для экстракта составила в среднем 17,5 мм, а для эфирного масла – 42,5 мм. Через 120 часов зона ингибиции уменьшилась соответственно до 10 и 40 мм.

Зона ингибиции в чашках Петри с *Rhizopus oryzae* составила в среднем для экстракта 11,6 мм, а для эфирного масла – 21,3 мм. Через 96 часов диски, обработанные экстрактом и эфирным маслом, были полностью покрыты воздушным мицелием гриба *R. oryzae*.

Экстракт ингибировал рост *Aspergillus niger* слабее, формируя зону ингибиции около 7,5 мм, а в случае эфирного масла - 12 мм. Через 120 часов зона ингибиции уменьшилась соответственно до 6 и 10,5 мм.

Обобщая результаты эксперимента, можно сделать вывод, что эфирное масло эстрагона показало более высокую антифунгальную активность, чем экстракт листьев, по отношению ко всем тестируемым грибам. Исследуемые ингибиторы проявили наибольшую противогрибковую активность по отношению к виду *Penicillium italicum*.

Эфирное масло эстрагона имеет промышленное значение. Ароматное мыло, изготовленное из него, используется как натуральное противогрибковое средство. Поскольку виды *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Rhizopus orizae* являются потенциально патогенными грибами, вызывающими микозы у людей, желательно, чтобы люди часто использовали мыло, содержащее эфирное масло эстрагона.

В последние годы подчеркивается важность биологической борьбы с патогенами, поэтому результаты нашего исследования будут использованы для создания антифунгальных средств лечебной и профилактической косметики.

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке

Комитета по науке МОНКС РА в рамках научного проекта № 21T-1F334.

Список литературы

1. Марьин А.А., Коломиец Н.Э. Лекарственные растения и биологически активные вещества противогрибкового действия. // Фундаментальная и клиническая медицина. 2017, т. 2, № 4, с. 45-55.

2. Дутова С.В. Фармакологические и фармацевтические аспекты иммунотропного действия извлечений из сырья эфирномасличных растений. // Дис. д.ф.н. Волоград, 2016, 330 с.

3. Агларова А.М., Зилфикаров И.Н., Северцева О.В. Биологическая характеристика и полезные свойства полыни эстрагон – *Artemisia dracunculus* L. (обзор). // Химико-фармацевтический журнал, 2008, т. 42, № 2, с. 31-35.

4. Маматова А.С. Фармакогностическое, фармакотехнологическое изучение полыни Artemisia g*melinii* и создание на ее основе фитосубстанций. // Дис. д.ф.н. Алмата, 2018, с. 185.

5. Kshirsagar S.G., Rao R.V. Antiviral and Immunomodulation Effects of *Artemisia* // Medicina. (Kaunas). 2021, 57(3), 217 p. doi: 10.3390/medicina57030217. PMID: 33673527; PMCID: PMC7997252.

6. Методы экспериментальной микологии: Справочник. // Под ред. Билай Б.И. Киев: И-во Наук. думка, 1982, 350с.

7. Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. // lsevier Press, 2004, 777 p.

ФУНГИЦИДНОЕ И ФУНГИОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА КЛЕТКИ КЛИНИЧЕСКОГО ИЗОЛЯТА *CANDIDA ALBICANS* **FA-1**

Андреева И.С., Ребус М.Е.

ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово

В настоящее время, в связи с ростом заболеваний, сопровождающихся различными иммунодефицитными состояниями, возрос интерес исследователей к поражениям различных органов и тканей организма человека патогенными и условно–патогенными грибами. Наиболее частыми возбудителями грибковых инфекций являются грибы рода *Candida*, способные вызывать широкий диапазон инфекций: от заболеваний кожи и слизистых оболочек до поражения практически любого органа, нередко

создавая при этом угрозу для жизни больных [1]. *Candida albicans* – самый распространенный вид, вызывающий около 90% случаев поверхностного и 50–70% – глубокого кандидоза, превосходя по патогенности остальные виды рода *Candida*, [2].

Согласно клиническим рекомендациям, в настоящее время для лечения кандидозных инфекций рекомендовано использовать препараты из группы азолов и препараты полиенового ряда [3, 4]. Отмечается тенденция к росту развития устойчивости грибов рода *Candida* к антигрибковым препаратам [5-7]. Широкое распространение получили препараты, содержащие живые бактерии-пробиотики на основе молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarium*, *L. casei* и др., препятствующих росту болезнетворных микроорганизмов, выступая также в роли антагонистов грибов рода *Candida*. Представители рода *Bacillus* также обладают широким спектром антимикробной активности в отношении патогенных микробов, включая кандиды [8, 9]. Однако, быстрое возникновение резистентности возбудителей инфекций снижает эффективность большинства традиционных противомикробных препаратов, как следствие существует большой спрос на непрерывные поставки новых антибиотиков для борьбы с этой проблемой.

Цель исследования состоит в оценке антимикотической активности секретируемых соединений спорообразующих бактерий, выделенных из природных условий, относительно клеток возбудителя кандидозов *Candida albicans.*

Материалы и методы

В качестве тест-объектов в работе использованы спорообразующие бактерии из состава коллекции природных изолятов лаборатории микробиологии окружающей среды и коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Определение антимикотической активности бацилл проводили на агаризованной среде ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) диффузионным методом перпендикулярных штрихов [10] относительно клинического изолята *Candida albicans* FA-1, выделенного из образца легкого больного, погибшего от генерализованной кандидозной инфекции, и коллекционного типового штамма *Candida albicans* Y-583. Положительный результат – наличие зоны лизиса или угнетения роста штриха патогена в зоне диффузии метаболитов бациллы. Высокий уровень продукции антибиотических веществ штаммами антагонистами обеспечивает зону задержки роста патогена не менее 10-15 мм.

Для инкубирования штаммов бацилл и штаммов кандид в жидкой среде применяли среду LB (Difco, USA) и жидкую среду Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). При определении титра жизнеспособных клеток в полученных суспензиях применяли агаризованные среды аналогичного состава. Микроскопию исследуемых штаммов проводили наблюдая

клетки на прижизненных и фиксированных, окрашенных препаратах с помощью микроскопа Axioskop 40 «Carl Zeiss» (Германия). Применяемые в работе штаммы микроорганизмов хранятся при низкотемпературном замораживании в коллекции природных изолятов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзор.

Результаты и обсуждение

Тестирование 46 исследуемых штаммов бацилл на наличие антифунгального действия относительно грамположительного штамма *Candida albicans* FA-1 показало, что все они в разной степени угнетают рост штамма кандиды (табл. 1), проявляя способность как к литическому, так и к фунгиостатическому действию.

Таблица 1. Ингибирующее влияние метаболитов штаммов бацилл на рост патогенного штамма *Candida albicans* FA-1, определенное диффузионным методом на агаризованной питательной среде.

Штаммы бацилл	*C. albicans* FA-1 Зона (мм)		Штамм бацилл	*C. albicans* FA-1 Зона (мм)	
	лизиса	угнетения		лизиса	угнетения
Cg-39	34	11	Sp-91	25	20
Sp-12	25	20	Sp-95	-	40
Sp-17	38	7	Sp-100	25	20
Sp-48	35	20	Sp-101	25	20
Sp-50	30	15	Sp-104	-	40
Sp-59	25	20	Sp-105	35	10
Sp-56	25	20	Sp-109	-	40
Sp-60	35	10	Sp-110	25	20
Sp-62	-	45	Sp-111	-	40
Sp-64	25	20	Sp-120	35	10
Sp-67	25	20	Sp-140	37	8
Sp-69	35	10	Sp-141	-	40
Sp-70	38	7	Ar-2-18	30	15
Sp-71	35	10	Ar-5-15	38	7
Sp-75	35	10	Ar-5-18	35	10
Sp-79	30	15	Ar-18-15	50	-
Sp-80	-	40	Ar-24-17	42	8
Sp-81	-	40	Ar-41-18	42	8
Sp-82	30	15	Ar-50-04	30	15
Sp-83	-	40	Ar-63-04	40	5
Sp-86	20	25	Ar-78-04	41	4
Sp-86-1	25	20	Ar-118	25	10
Sp-90	30	15	Cb-527	38	7

Зоны лизиса и угнетения роста штамма *Candida albicans* FA-1 под влиянием наиболее активных штаммов достигали 40-50 мм, т.е. простирались на всю длину высеянного штриха патогена (табл. 1; рис. 1). Следует отметить также, что ряд бацилл обладали ингибирующей активностью по отношению к грамположительным штаммам бактерий *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*, в то время как грамотрицательные штаммы *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* проявили к

метаболитам бацилл резистентность. Наблюдаемое слабое угнетение роста штриха грамотрицательного штамма *Escherichia coli* можно считать незначительным.

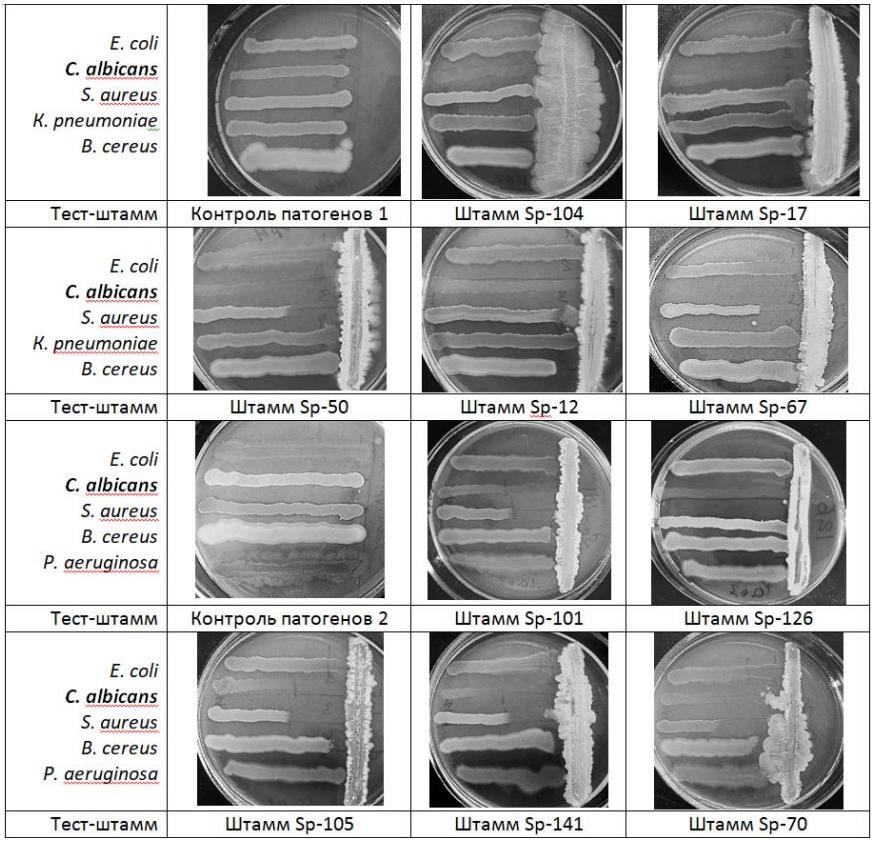


Рис.1. Определение диффузионным методом наличия антимикробной активности штаммов бацилл относительно патогенных тест-штаммов на агаризованной питательной среде ГРМ.
Примечание: по вертикали высеяны штрихи штаммов бацилл, по горизонтали – штрихи патогенных тест-штаммов.

Интересные результаты получены при совместном культивировании штаммов бацилл и штаммов кандид в жидкой среде LB и среде Сабуро (табл. 2). Эти две среды, LB и Сабуро, отличаются не только составом, но и значением pH: 7,2 для среды LB, где одинаково хорошо растут как исследуемые бациллы, так и штаммы кандид; и

pH 5,4 для среды Сабуро, где бациллы расти не могут, это значение pH среды для них не пригодно, тогда как для штаммов кандиды оно оптимально.

В таблице 2 приведены результаты индивидуального и совместного культивирования в жидких средах LB и Сабуро штамма бациллы Cb-527, ранее показавшего на агаризованной среде высокую активность против дрожжей рода *Candida*, и двух штаммов кандид – клинического изолята штамма *C. albicans* FA-1 и типового коллекционного штамма *C. albicans* Y-583.

Среда LB. При культивировании на среде LB при индивидуальном высеве наблюдается прирост биомассы всех трех штаммов, в то время как на среде Сабуро штамм бациллы не растет, титр равен нулю на всем протяжении культивирования.

При совместном культивировании с дрожжами на среде LB штамм Cb-527 растет активно, размножение клеток дрожжей при этом ингибируется его метаболитами, титр жизнеспособных клеток обоих штаммов кандид в условиях опыта не обнаруживается. Микроскопия опытных суспензий показала уменьшение числа клеток дрожжей во время совместного культивирования со штаммом Cb-527, к 18 ч. инкубирования клетки дрожжей в поле препарата не наблюдали, или обнаруживали в единичном количестве.

Среда Сабуро. Совместное культивирование штаммов кандид и бациллы в среде Сабуро приводит к обратным результатам: титр клеток бациллы равен нулю, как следствие, отсутствуют в среде Сабуро и характерные для штамма Cb-527 антигрибковые метаболиты – условия для роста штаммов кандид в данном случае наиболее благоприятны (табл. 2).

Следует отметить, что титр штамма Cb-527 при совместном культивировании с дрожжами по сравнению с контрольным индивидуальным высевом также несколько снижен.

Таблица 2. Антимикотическое действие секретируемых метаболитов штамма бациллы Cb-527 относительно штаммов дрожжей *C. albicans* FA-1 и *C. albicans* Y-583 при совместном инкубировании в жидких питательных средах LB и Сабуро.

Штамм	Время культивирования (час) / Питательная среда							
	0		3		5		18	
	LB	Сабуро	LB	Сабуро	LB	Сабуро	LB	Сабуро
Титры жизнеспособных клеток при индивидуальное культивирование штаммов (КОЕ/мл)								
C. albicans Y-583	$2,3\times10^5$	$2,4\times10^5$	$2,7\times10^5$	$3,2\times10^5$	$4,5\times10^5$	$6,0\times10^5$	$1,7\times10^7$	$1,4\times10^7$
C. albicans FA-1	$2,6\times10^5$	$2,6\times10^5$	$2,5\times10^5$	$5,0\times10^5$	$5,5\times10^5$	$1,0\times10^7$	$3,2\times10^7$	$3,6\times10^7$
Cb-527	$9,0\times10^5$	0	$2,5\times10^7$	0	$9,0\times10^7$	0	$1,2\times10^9$	0
Титры жизнеспособных клеток при совместном культивирование штамма *C. albicans* Y-583 и штамма бациллы Cb-527 (КОЕ/мл)								
C. albicans Y-583	0	$2,3\times10^5$	0	$1,0\times10^5$	0	$5,5\times10^7$ *	0	0
Cb-527	$8,0\times10^5$	0	$4,0\times10^7$	0	$6,5\times10^7$	0	$3,5\times10^5$	0
Титры жизнеспособных клеток при совместное культивирование штамма *C. albicans* FA-1 и штамма бациллы Cb-527 (КОЕ/мл)								
C. albicans FA-1	0	$3,2\times10^5$	0	$5,0\times10^5$	0	$4,0\times10^6$ *	0	0
Cb-527	$8,0\times10^5$	0	$1,5\times10^7$	0	$1,0\times10^5$	0	$2,0\times10^5$	0

Примечание: *- мелкие, не типичные колонии

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о ярко выраженном фунгицидном и фунгиостатическом действии исследованных штаммов спорообразующих бактерий относительно патогенных штаммов рода *Candida*, что позволяет наиболее активные из них рассматривать как пригодные для дальнейшей разработки в качестве противогрибковых препаратов.

Работа выполнена в рамках ГЗ 11/21.

Список литературы

1. Еноктаева, О. В. *Candida* lisitaniae — условно-патогенный представитель микрофлоры человека / О. В. Еноктаева, К. А. Буракова, К. В. Кузьмина // Успехи медицинской микологии : журн. — 2019. — Т. 20. — С. 210–213. — ISSN 2310-9467.
2. Масюкова С.А., Устинов М.В., Ильина И.В. Глубокий кандидоз - актуальность и перспективы проблемы. // Русский Микробиологический Журнал. 2004; 4: 189.
3. Ivanova LV, Barancevich EP, Shlyahto EV. The resistance of fungi pathogens to antimycotics (review). Problemy medicinskoj mikologii. 2011; 13(1):14-17. (In Russ.). http://www.rusmedserv.com/mycology/html/mapo_1_2011.pdf;
4. Vasil'eva NV, Klimko NN, Cinzerling VA. Diagnosis and treatment of invasive mycoses: current recommendations. Vestnik Sankt-Peterburgskoj medicinskoj akademii posldiplomnogo obrazovaniya. 2010;8:5-18 (In Russ.). https://mycology.szgmu.ru/files/St_%20from_Vestnik_MAPO_No_04_10.pdf.
5. Беженар М.Б., Плахова К.И. Механизмы развития резистентности к противогрибковым препаратам грибов рода *Candida* при рецидивирующем течении урогенитального кандидоза. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2020;38(1):15-23. https://doi.org/10.17116/molgen20203801115.
6. Желтикова Т.М. Мониторинг резистентности клинических штаммов дрожжей рода *Candida* к флуконазолу. Медицинский совет. 2017; 2: 70-24.
7. Veselov AV, Kozlov RS. Invasive candidiasis: modern aspects of epidemiology, diagnosis, treatment and prevention in various categories of patients.//Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya. 2016;18(2):20.(In Russ.).
https://elibrary.ru/item.asp?id=27025705]Jlyfr.
8. Chandra Datta Sumi, Byung Wook Yang, In-Cheol Yeo, Young Tae Hahm Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. // November 2014Canadian Journal of Microbiology 61(2). DOI:10.1139/cjm-

2014-0613,
9. Савустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* // Актуальная инфектология (2016) № 2 (11) С. 35-44. DOI:10.22141/2312-413x.2.11.2016.7752].
10. Егоров И.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. / Н.С. Егоров. - М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. - 528 с. ISBN 5-211-04669-2; ISBN 5-02-033595-9.

АНТИФУНГАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ОБРАЗУЕМЫХ АКТИНОМИЦЕТАМИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ КАЗАХСТАНА

Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Спанкулова Г.А., Татаркина Л.Г., Момбекова Г.А., Баймаханова Б.Б., Балгимбаева А.С., Треножникова Л.П.
Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

Грибковые инфекции — одна из наиболее актуальных и до конца не решенных задач современной медицины. По данным Всемирной организации здравоохранения, 90% жителей планеты минимум раз в жизни сталкивались с грибковыми заболеваниями, а у каждого 3-го человека отмечают микоз [1]. Количество грибковых инфекций растет в связи с увеличением числа лиц с иммунодефицитными заболеваниями, онкогематологической патологией, пересадкой органов, коронавирусной пандемией, при этом возрастает роль грибов, считавшихся ранее непатогенными. В настоящее время в список потенциальных возбудителей микозов включено около 400 видов грибов [2]. Принимая во внимание распространённость микозов и многочисленные случаи резистентности патогенных грибов к применяемым лекарственным средствам, актуальной задачей медицинской и фармацевтической химии является создание новых эффективных противогрибковых лекарственных препаратов для их лечения [3].

Широкое распространение резистентных возбудителей, повторные «открытия» уже известных биологически активных веществ, заставляют расширять границы скрининга, меняя его методы и источники получения продуцентов [4]. Поэтому необычные природные субстраты, экстремальные экосистемы являются в настоящее время наиболее востребованными источниками исследования, именно из них можно ожидать получения новых природных биологически активных веществ с уникальными свойствами [5]. Морская среда, почвы с высоким уровнем засоления и щелочности, активно исследуются как источники получения новых вторичных

метаболитов с антибактериальными и антифунгальными свойствами [6]. Новые скрининговые программы по выделению природных соединений предполагают использование иных подходов, и, прежде всего, избирательных условий культивирования микроорганизмов при высоких значениях солей и pH в средах.

Целью данной работы было исследование способности актиномицетов, выделенных из солончаковых почв Казахстана, образовывать природные соединения с антифунгальными свойствами в экстремальных условиях роста.

В исследование были взяты 100 штаммов экстремофильных актиномицетов, которые культивировали на агаровой питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт, пептон и глюкозу, а также хлорид аммония или бикарбонат натрия. Экстремофильные актиномицеты инкубировали на среде, оптимальной для их роста, при температуре 280 С в течение 10 суток.

Биосинтез биологически активных продуктов осуществляли глубинным культивированием на трех вариантах сред, в состав которых входили соевая мука, дрожжевой экстракт, пептон, гидролизат казеина, глюкоза или крахмал. Для создания альтернативных условий роста в среды вносили хлорид натрия в концентрации 2,5 и 5,0% (pH 7,0) или бикарбонат натрия (0,25% и 0,5%, pH 8,0 и 9,0). Ферментацию осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл в шейкере-инкубаторе (200 об/мин) при температуре 28-290 С в течение 120 ч. Засев штамма в жидкую среду проводили кусочком агара с растущей культурой 2х2 см.

После окончания ферментации биомассу отделяли от жидкой фазы центрифугированием при 5000 об/мин и отжимали под прессом до 70% влажности. Биологически активные вещества извлекали из фильтрата культуральной жидкости н-бутанолом, из биомассы 96% этиловым спиртом. Экстракты упаривали на ротационном испарителе до сухого остатка и активные вещества переводили в 80% этиловый спирт.

Антифунгальные свойства полученных препаратов изучали методом лунок на питательном агаре Hi-Media при температуре 280 С в течение 72 часов в отношении *Aspergillus niger* и 24 часов в отношении *Candida guilliermondii*, которые являлись тест-культурами в данном исследовании.

В результате выполненных работ было установлено, что 35 штаммов экстремофильных актиномицетов в альтернативных условиях роста образуют природные соединения, активные против дрожжеподобных грибов (*Candida guilliermondii*) и 29 штаммов продуцируют вещества, активные против мицелиальных грибов (*Aspergillus niger*).

51,4% штаммов экстремофильных актиномицетов образовывали антифунгальные вещества, активные в отношении *Candida guilliermondii*, в присутствии 2,5% хлорида натрия, 25,7% штаммов продуцировали эти

вещества в более экстремальных условиях – в присутствии 5,0% хлорида натрия. 22,9% штаммов актиномицетов образовывали активные вещества с антифунгальными свойствами против дрожжеподобных грибов в щелочных условиях, причем большинство штаммов продуцировали данные соединения при pH 9,0 в присутствии 0,5% бикарбоната натрия.

37,9% штаммов экстремофильных актиномицетов образовывали антифунгальные соединения, активные в отношении *Aspergillus niger*, в присутствии 2,5% хлорида натрия, 27,6% штаммов – в присутствии 5,0% хлорида натрия. 34,5% штаммов актиномицетов образовывали активные вещества с антифунгальными свойствами против мицелиальных грибов в щелочных условиях, 24,1% от общего количества экстремофильных актиномицетов - при pH 9,0.

Выполненные нами исследования дают основание предположить необходимость дальнейшего изучения полученных нами в экстремальных условиях биологически активных соединений с антифунгальной активностью, как возможно новых перспективных антимикотиков.

Список литературы

1 Центр по контролю и профилактике заболеваний США [Electronic Resource] http://www.cdc.gov/fungal/global/index.html.

2 Gilchrist M., Wade P., Ashiru-Oredope D., et al. Antimicrobial Stewardship from Policy to Practice: Experiences from UK Antimicrobial Pharmacists. Infect. Dis. Ther. 2015, 4., Suppl. 1. – P. 5164.

3 Vandeputte P., Selene F., Coste A.*T. A*ntifungal resistance and new strategies to control fungal infections. Int. J. Microbiol. 2012, 2012:713687 (doi: 10.1155/2012/713687).

4 Phoebe C.H., Cambie J., Albert F.G., et al. Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds // J. Antibiotics. – 2001. – Vol. 54. – P. 56-65.

5 Basilio A., Gonzalez I., Vicente *M. F.*, et al. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity // J. Appl. Microbiol. – 2003. - Vol. 95. - P. 814-817.

6 Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 2002. – Vol. 28. – P. 56–63.

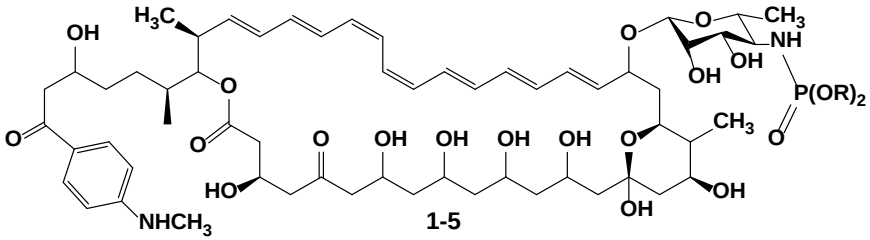
ДИАЛКИЛ(АРИЛ)АМИДОФОСФАТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПЕРИМИЦИНА: ПОЛУЧЕНИЕ, ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ, РАЗРАБОТКА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ

Белахов В.В.[1], Чистякова Т.Б.[2], Смирнов И.А.[2], Колодязная В.А.[3]

[1]Технион – Израильский институт технологии, Хайфа, Израиль
[2]Санкт-Петербурский государственный технологический институт
[3]Санкт-Петербурский государственный химико-фармацевтический университет

Противогрибковый антибиотик перимицин из-за неприемлемых медико-биологических свойств, связанных с высокой токсичностью, трудной переносимостью при системном использовании и сравнительно узким спектром противогрибковой активности, не нашел применения в лекарственной терапии микозов в отличие от других гептаеновых макролидных антибиотиков, таких как амфотерицин В, кандицидин, леворин и микогептин.

Известно, что химическая модификация полиеновых макролидных антибиотиков (ПМА) приводит к созданию менее токсичных производных с улучшенными медико-биологическими свойствами [1, 2]. Полусинтетические производные перимицина различной структуры, полученные химической модификацией, обладают высокой антифунгальной активностью и меньшей токсичностью [3-5]. Продолжая исследования по поиску новых полусинтетических производных этого гептаенового макролидного антибиотика, нами показано, что в результате реакций перимицина с диалкил(арил)фосфитами в присутствии органического основания происходит образование его диалкил(арил)амидофосфатных производных 1-5 (схема 1). Изученная реакция может рассматриваться как разновидность реакции Атертона-Тодда, синтетические возможности которой подробно обсуждены в обзоре [6].



1-5

R = CH_3 (**1**); C_2H_5 (**2**); $CH_3(CH_2)_3$ (**3**); C_6H_5 (**4**); $\{Si(CH_3)_3\}_2$ (**5**)

Фармакологическими исследованиями установлено, что острая токсичность (LD50) диалкил(арил)амидофосфатных производных перимицина 1-5 была в 3-3,5 раза меньше, чем у исходного антибиотика [7] и варьировала от 770 до 800 мг/кг (мыши, внутривенно).

Биологические исследования обнаружили, что производные перимицина 1-5 обладали выраженной антифунгальной активностью в отношении 15 тест-культур рода *Candida*. Показано, что соединения 1, 2 и 4 проявили высокое противогрибковое действие в отношении *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* и *Candida auris*, причем их антифунгальная активность превышала исходный антибиотик (таблица 1). В отношении других тест-культур дрожжеподобных грибов рода *Candida* противогрибковая активность полученных производных перимицина была на уровне исходного антибиотика или уступала ему.

Таблица 1. Минимальная фунгистатическая концентрация (МфсК) диалкил(арил)амидофосфатных производных перимицина 1-5 (мкг/мл).

Тест-культура	Соединение					Перимицин
	1	2	3	4	5	
Candida albicans	0.78	1.56	3.12	0.78	6.25	3.12
Candida tropicalis	1.56	1.56	3.12	1.56	6.25	3.12
Candida parapsilosis	3.12	3.12	6.25	3.12	6.25	6.25
Candida glabrata	0.78	1.56	6.25	1.56	12.5	3.12
Candida krusei	3.12	3.12	6.25	3.12	12.5	6.25
Candida guillermondii	12.5	12.5	25.0	12.5	25.0	12.5
Candida lusitaniae	1.56	1.56	6.25	1.56	12.5	3.12
Candida kefyr	3.12	6.25	6.25	3.12	6.25	3.12
Candida utilis	1.56	3.12	3.12	1.56	6.25	1.56
Candida lypolytica	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	6.25
Candida norvegensis	6.25	12.5	12.5	6.25	25.0	6.25
Candida auris	0.78	1.56	6.25	0.78	3.12	6.25
Candida haemulonii	12.5	25.0	25.0	12.5	25.0	12.5
Candida famata	3.12	12.5	50.0	3.12	25.0	3.12
Candida catenulata	6.25	3.12	25.0	3.12	25.0	3.12

Следует подчеркнуть, что наиболее распространенным возбудителем кандидозов остается *Candida albicans*, на долю которого приходится около 50% всех случаев заболевания [8, 9]. Вместе с тем, за последние 15-20 лет отмечено значительное увеличение количества грибковых инфекций, вызываемых не-*albicans*, а другими видами, такими, как *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* и *Candida krusei* [10]. Кроме того, биологические исследования показали высокую активность соединений 1, 2, 4 и 5 в отношении тест-культуры *Candida auris* - нового мультирезистентного возбудителя инвазивного кандидоза [11, 12], который включен Всемирной Организацией Здравоохранения в «Список приоритетных грибковых патогенов» в качестве грибкового патогенного микроорганизма, имеющего критически важное значение [13]. В связи с этим, высокая противогрибковая активность целого ряда диалкил(арил)амидофосфатных производных перимицина в отношении тест-культур *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae* и *Candida auris*, их низкая токсичность, а также лучшая растворимость в воде и водных растворах, являются важными результатами, открывающими перспективы для поиска потенциальных антимикотиков с улучшенными медико-биологическими, фармакологическими и биофармацевтическими свойствами среди полусинтетических производных перимицина против возбудителей кандидоза.

Анализ медицинских информационных систем и путей развития биоинформатики показывает, что для поиска новых направлений высокоэффективного синтеза и производства лекарственных препаратов, в том числе противогрибковых, а также для диагностики и лечения инфекционных заболеваний применяются различные типы информационных систем [14, 15].

Нами разработана расширяемая интеллектуальная автоматизированная информационная система, позволяющая осуществлять поддержку принятия решений: 1) по выбору исследователем перспективных направлений поиска новых высокоэффективных ПМА; 2) по поиску ПМА в базах данных, имеющихся в интеллектуальной системе, с учетом их терапевтической эффективности, токсичности, а также стоимости; 3) по подбору врачом-клиницистом необходимых ПМА с учетом вида патогенного гриба и состояния пациента; 4) по поддержке принятия решений при диагностике микозов различной этиологии с учетом признаков и характеристик грибковых инфекций. Информационное обеспечение системы содержит гибкие дополняемые базы данных по ПМА, сведения о различных таксономических группах патогенных грибов, медицинские параметры протекания грибковых инфекций, базы знаний, включающие правила диагностики грибковых заболеваний, а также схемы лечения микозов в зависимости от состояния пациента и др. База данных дополнена полусинтетическими производными

ПМА, полученными в результате химической модификации, которые обладают выраженной противогрибковой активностью в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Следовательно, интеллектуальная автоматизированная информационная система позволит рационально подобрать высокоэффективные антимикотики против дрожжеподобных грибов рода *Candida*, а также других патогенных грибов, вызывающих грибковые инфекции.

Таким образом, химическая модификация перимицина и других ПМА, не нашедших применение для лечения микозов различной этиологии из-за неприемлемых медико-биологических свойств, может рассматриваться как перспективное направление поиска новых малотоксичных высокоэффективных антифунгальных препаратов на их основе.

Список литературы

1. Omelchuk O.A., Tevyashova A.N., Shchekotikhin A.E. Recent advances in antifungal drug discovery based on polyene macrolide antibiotics. Russ. Che*m. R*ev. 2018; 87 (12): 1206-1225.
2. Belakhov V.V., Garabadzhiu A.V., Chistyakova T.B. Polyene macrolide antibiotic derivatives: preparation, overcoming drug resistance, and prospects for use in medical practice. Pharm. Chem. J. 2019; 52 (11): 890-901.
3. Lechevalier H., Borowski E., Lampen J.O., Schaffner C.P. Water-soluble N-acetyl derivatives of heptaene macrolide antifungal antibiotics: microbiological studies. Antibiot. Chemotherapy. 1961; 11: 640-647.
4. Mazerski J., Bolard J., Borowski E. Self-association of some polyene macrolide antibiotics in aqueous media. Biochim. Biophys. Acta. 1982; 719 (1): 11-17.
5. Czerwinski A., Grzybowska J., Borowski E. N-Dimethylaminoacyl derivatives of polyene macrolide antibiotics. J. Antibiot. 1986; 39 (7): 1025-1027.
6. Corre S.S., Bercel M., Couthon-Gourves H., et al. Atherton-Todd reaction: mechanism, scope and applications. Beilstein J. Org. Chem. 2014; 10: 1166-1196.
7. Oswald E.J., Reedy R.J., Randall W.A. An antifungal agent, 1968, produced by a new *Streptomyces* species. Antibio*t. A*nn. 1956; 1955-1956: 236-239.
8. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: БИНОМ. 2008: 155-158.
9. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: Триада-Х. 2000: 21-23.
10. Веселов А.В., Козлов Р.С. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2016; 18 (2), 104 с.
11. Cernakova L., Roudbary M., Bras S., et al. *Candida auris* - A Quick Review on

Identification, Current Treatments, and Challenges. Int. J. Mol. Sci. 2021; 22 (9): 4470.
12. Босак И.А., Выборнова И.В., Чилина Г.А. и др. Изучение вирулентности клинических изолятов *Candida auris* в экспериментальной модели на животных. Проблемы мед. миколог. 2022; 24 (4): 82-88.
13. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization. 2022: 33 p.
14. Кобринский Б.А., Зарубина Т.В. Медицинская информатика. М.: Академия, 2013: 192 с.
15. Омельченко В.П., Демидова А.А. Медицинская информатика. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2016: 527 с.

АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЙНЫХ СОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗОЛА

Белоусова З.П., Кленова Н.А., Нарыкина А.И., Гоглова А.В., Шорохова И.А., Барабошкина А.В., Кузнецова А.А.
Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева

Поиск новых эффективных антибиотических соединений остается актуальным в связи со способностью микроорганизмов быстро формировать резистентность к уже используемым препаратам. На биологическом и химическом факультетах Самарского университета в течение многих лет ведутся совместные работы, включающие синтез перспективных антибиотических соединений и их тестирование на наличие антифунгальных и антибактериальных свойств.

Из литературных данных известно о токсичности производных имидазола, влияющих на проницаемость клеточных мембран за счет связывания с фосфолипидными компонентами, а также об их способности ингибировать активность оксидазных и пероксидазных ферментных систем. Их механизм изучен на примере клотримазола. В связи с этим проведен синтез новых соединений, представляющих собой четвертичные аммонийные соли на основе производных имидазола, структура которых подтверждалась ИК и ЯМР спектрами. Они были протестированы на наличие у них антифунгальных и антибактериальных свойств. Тест-объектами служили *Aspergilus fumigatus* (антифунгальное действие) и *Escherichia coli* (антибактериальное действие). Штамм *Aspergilus fumigatus* был выделен из почвенной суспензии и определен по морфологическим признакам с использованием определителя патогенных и условно патогенных грибов (Д. Саттон, А. Фотергилл, М.

Ринальди, Москва, «Мир», 2001). Для тестирования антибактериальных свойств использован штамм *E. coli* 17 из колибактерина. Тестирование проводили с помощью диск-диффузионного метода, меняя матрицы для изучаемых соединений и их обработку. В качестве матриц применяли диски из фильтровальной бумаги, а также пленки и гели бактериальной и пектинбактериальной целлюлозы, полученные в ходе культивирования очищенного от дрожжей штамма *Megusomyces gesevii* на среде Хестрина-Шрамма. Выбранные соединения растворяли в диметилсульфоксиде. Концентрации соединений 1 мг/мл (действующая концентрация 10 мкг), 250 мкг/мл (действующая концентрация 2,5 мкг). Обрабатывали матрицы следующим образом: либо добавляли на стерильные образцы размером 5-6 мм, помещенные на свежие посевы, по 10 мкл растворов соединений, либо после добавления соединений они высушивались в эксикаторе и вновь подвергались стерилизации 120°С, 45 минут. В данном случае образцы помещались на посевы сухими. В гели растворы соединений добавляли в определенную навеску (соблюдая принцип сохранения действующих концентраций), затем гели распределяли в пленку, высушивали. Полученные из гелей пленки обозначали как «вторичные» в отличие от пленок, полученных сразу при культивировании.

Незначительные антибактериальные свойства были обнаружены у 1,3-дибензилимидозолий хлорида и 1,3-диоктил-2-метилимидозолий бромида, которые выражались в основном в появлении зон ограниченного роста *Escherichia coli* величиной 13-14 мм (в контроле 5-6 мм). Антифунгальные свойства выражались в снижении площади зарастания *Aspergilus fumigatus* на 2-е сутки роста при действии 1,3-диоктил-2-метилимидозолий бромида.

Значительные антибактериальные и антифунгальные свойства были обнаружены у 1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромида, причем при использовании действующей концентрации около 2,5 мкг (раствор 250 мкг/мл). Наибольший эффект наблюдали в случае использования замачивания в растворе навески геля и приготовления образцов из «вторичной» пленки (таблица).

Антифунгальное действие 1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромида на рост *Aspergilus fumigatus* превышало эффект широко используемого препарата клотримазола (1-[(2-хлорфенил)дифенилметил]-1Н-имидазол). Эффект был значительным как в случае использования пленок, так и гелей. Данное производное проявляло и значительное бактерицидное действие по отношению к *Escherichia coli*, в данном случае использование гелей имело достоверное преимущество по сравнению с первичными пленками. Интересным является тот факт, что 1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромид отличается от 1,3-диоктил-

2-метилимидозолий бромида только положением метильной группы, а бактерицидное и фунгицидное действие первого значительное, тогда как у второго бактерицидное меньше практически в 3 раза, а фунгицидное отсутствует (есть только фунгиостатическое). Стерически молекула 1,3-диоктил-2-метилимидозолий бромида более затруднена по сравнению с молекулой 1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромида.

Таблица. Антибиотические свойства 1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромида, 250мкг/мл.

Название соединения	Матрица	Тест-объект	Зона отсутствия роста, мм
Диметилсульфоксид (растворитель)	Первичная и вторичная гель-пленки бактериальной целлюлозы	*Aspergillus fumigatus Escherichia coli*	Зоны вокруг образцов отсутствуют
1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромид	Первичная гель-пленка бактериальной целлюлозы	*Aspergillus fumigatus*	27,9±3,0
1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромид	Вторичная гель-пленка бактериальной целлюлозы	*Aspergillus fumigatus*	24,4±2,4
клотримазол	Первичная гель-пленка бактериальной целлюлозы	*Aspergillus fumigatus*	10,0±4,7 P<0,05
клотримазол	Вторичная гель-пленка бактериальной целлюлозы	*Aspergillus fumigatus*	14,0±2,6 P<0,01
1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромид	Первичная гель-пленка бактериальной целлюлозы	*Escherichia coli*	22,0±0,7
1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромид	Вторичная гель-пленка бактериальной целлюлозы	*Escherichia coli*	26,7±0,8*

* P<0,01 по отношению к матрице из первичной пленки

Анализ наиболее устойчивых конформаций их молекул показал, что

второе соединение может оказаться менее эффективным ингибитором ферментативных процессов. Можно предположить, в случае первого соединения (1,3-диоктил-4-метилимидазолий бромида) существует более эффективное необратимое ингибирование процессов за счет стерической комплементарности конформации его молекулы и места связывания фермента.

Таким образом, синтез новых производных имидазола и тестирование их антибиотических свойств, позволило обнаружить новое перспективное соединение – 1,3-диоктил-4-метил-имидазолий бромид, проявляющее значительные бактерицидные и фунгицидные свойства при достаточно низких концентрациях (250 мкг/мл).

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОЛОРАДСКИХ ЖУКОВ И ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ

Демьянкова М.В[1]., Ефименко Т.А.[1], Якушев А.В.[2], Глухова А.А.[1], Хуснетдинова Т.И.[2], Садыкова В.С.[1], Ефременкова О.В.[1]

[1]НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва

[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение Применение антибиотиков создает селективное давление на микроорганизмы и приводит к появлению устойчивых (антибиотикорезистентных) форм. Ситуация с антибиотикорезистентностью патогенных микроорганизмов постоянно усугубляется и по прогнозу Всемирной организации здравоохранения к 2050 году смертность от инфекций возрастет и станет примерно такой же высокой, как от онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Одним из способов решения проблемы антибиотикорезистентности является поиск новых эффективных антимикробных соединений. Основным источником природных антибиотиков являются микроорганизмы, выделенные из сложных многокомпонентных биоценозов, в классическом варианте – из почв [2]. Опираясь на теорию Гаузе, мы рассматриваем антибиотики как эволюционно выработанное химическое оружие в межвидовой борьбе за существование в мире микробов, и, соответственно, микроорганизмы из таких биоценозов – как потенциальных продуцентов новых антибиотиков [3].

Объектами нашего исследования были бактерии – представители сложного многокомпонентного биоценоза, а именно микробиоты кишечника колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*. Особый интерес

к изучению колорадского жука в мире обусловлен тем, что он является одним из наиболее хозяйственно опасных насекомых – вредителей сельскохозяйственных культур, а именно растений семейства пасленовых. Основной ущерб наносится картофелю, листья которого являются единственным источником питания колорадского жука и его личинок, и могут быть практически полностью уничтожены [4]. Несмотря на предшествующие описания бактериальных комплексов, ассоциированных с колорадским жуком, антибиотическая активность микроорганизмов этих комплексов ранее не изучалась. Перед нами стояла задача выделить и изучить антибиотические свойства бактерий, ассоциированных с колорадским жуком и его пищей. Описание микробного разнообразия кишечника колорадских жуков не являлось специальной целью исследования, а видовая идентификация выделенных бактерий проводилась параллельно с анализом литературы по антибиотикам, образованным представителями исследуемых видов.

Материалы и методы Образцы для исследований, а именно листья картофеля, живущие на них личинки третьего возраста и имаго колорадского жука, собраны вручную в июле 2020 года на опытных полях Чашниковской биологической станции МГУ (Московская область). Поля не обрабатывались биопестицидами или химикатами.

Выделение микроорганизмов из исследуемых образцов осуществляли путем посева гомогенатов кишечника личинок и имаго колорадских жуков, а также гомогенатов листьев картофеля. Посев проводили на агаризованную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 0,3, пептон – 0,3, дрожжевой экстракт – 0,3, агар – 15. Образцы инкубировали при 28°C в течение 14 сут. Глубинное культивирование бактерий проводили в восьми жидких питательных средах, разработанных для продуцентов антибиотиков в Институте новых антибиотиков имени Гаузе [5].

Видовую идентификацию бактерий проводили на основании анализа последовательности гена 16S рРНК. Геномную ДНК из бактериальной биомассы выделяли с использованием набора PowerSoil DNA Kit (MO BIO, Карлсбад, Калифорния, США). ПЦР гена 16S рРНК проводили с использованием набора BioMaster HS-Taq PCR-Sp (Биолабмикс, Новосибирск, Россия) с универсальными бактериальными праймерами: 27f (AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG) и 1492r (TAC GGY TAC CTT GTT ACG) [6].

ПЦР проводили на термоциклере 2720 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, США) по следующей программе: (1) 94 °C в течение 5 мин; (2) 30 циклов с температурными интервалами 94 °C в течение 1 мин, 51 °C в течение 1 мин и 72 °C в течение 2 мин; (3) 72 °C в течение 7 мин. Нуклеотидные последовательности определяли методом Сэнгера

на Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Беверли, Массачусетс, США) с использованием универсальных бактериальных праймеров: 27f, 341f (CCT ACG GGA GGC AGC AG), 785f (GGM TTA GAT ACC TGG TAG TCC), 1114f (GCA ACG AGC GCA ACC C), 519r (GTA TTA CCG CGG CTG CTG), 907r (CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT), 1100r (GGG TTG CGC TCG TTG), 1392r (ACG GGC GGT GTG TRC) и 1492r. Программа Mega 7 и наиболее близкие референсные последовательности гена 16S рРНК, полученные из баз данных GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) и проекта Ribosomal Database Project (rdp.cme.msu.edu/), были использованы для сборки нуклеотидных последовательностей [7].

Для определения антибиотической активности культуральных жидкостей методом диффузии в агар использовали тест-штаммы: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. pumilus* NCTC 8241, *B. mycoides* 537, *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (метициллинрезистентный штамм, MRSA), *St. aureus* FDA 209P (метициллинчувствительный штамм, MSSA), *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ B-4177 (устойчивый штамм к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина штамм *Leuconostoc mesenteroides*, VRLM), *Mycobacterium smegmatis* ВКПМ Ac 1339 и Myc. *smegmatis* 155 mc2; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (множественная лекарственная устойчивость, МЛУ); грибы *Aspergillus niger* ИНА 00760 и *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259.

Результаты Из кишечника имаго (11) и личинок (10) *Lep. decemlineata*, а также ее корма – листьев *Sol. tuberosum* (11) выделено 32 штамма бактерий, из которых у 18 обнаружена антимикробная активность (56%). Эти штаммы были идентифицированы до вида или рода путем анализа гена 16S рРНК с учетом совпадения морфологических характеристик штамма с описанием соответствующих таксонов. Видовая идентификация изучаемых бактерий показала, что бактериальный кишечный комплекс колорадского жука включает как известные резидентные бактерии, ассоциированные с животными (*Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus argenteus*, *Gordonia sp.*), так и транзиторные бактерии из корма, связанные с растениями (*Micrococcus aloeverae*, *Neobacillus drentensis*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas rhizosphaerae*). Среди актинобактерий преобладали стрептомицеты, но были выделены и представители других родов актинобактерий («редких» родов), а именно *Gordonia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardia* (таблица).

Таблица. Видовая идентификация бактерий, проявляющих антимикробную активность.

Источник выделения	Род, вид, штамм	Номер GenBank	Впервые обнаружена антимикробная активность*
Имаго	*Gordonia* sp. ИНА 01411	ON763831	МБ
	Micromonospora phytophila ИНА 01405	ON763823	
	Neobacillus drentensis ИНА 01404	ON763829	ГО
	Pseudomonas gessardii ИНА 01409	ON763830	МБ
	Streptomyces chartreusis ИНА 01406	ON763824	
	S. clavifer ИНА 01407	ON763822	ГП
	S. microflavus ИНА 01408	ON763820	МБ
	S. rishiriensis ИНА 01410	ON763821	
Личинка	*Bacillus thuringiensis* ИНА 01412	ON763835	МБ
	Pantoea agglomerans ИНА 01413	ON763834	МБ
	Pseudomonas poae ИНА 01414	ON763833	МБ
	Pseudomonas rhizosphaerae ИНА 01417	ON763832	
	S. badius ИНА 01416	ON763825	ГП, МБ
	S. coelicoflavus ИНА 01415	ON763826	
Листья картофеля	*Micrococcus aloeverae* ИНА 01419	ON763837	
	Nocardia salmonicida subsp. *cummidelens* ИНА 01418	ON763827	ГП
	Staphylococcus argenteus ИНА 01420	ON763836	ПГ
	S. camponoticapitis ИНА 01421	ON763828	ГП, ПГ

*Антимикробная активность против грамположительных бактерий (ГП), микобактерий (МБ), грамотрицательных бактерий (ГО), противогрибковая активность (ПГ).

Заключение В составе микробиоты кишечника *Leptinotarsa decemlineata* впервые описаны: *Micromonospora* phytophila, *Neobacillus drentensis*, *Pseudomonas* gessardii, *P. poae*, P. *rhizosphaerae*, *Pantoea agglomerans*, *Streptomyces* chartreusis, S. clavifer, S. *microflavus*, *S.* rishiriensis, S. *badius* и S. coelicoflaus.

Виды бактерий, выделенные из кишечной микробиоты колорадских жуков, их личинок и их пищи – листьев картофеля, различаются, что может свидетельствовать о видоспецифическом составе микробиоты имаго и личинок.

Штаммы, продуцирующие противомикробные соединения, были оценены как перспективные и отобраны для последующего химического исследования на основании активности, впервые описанной у соответствующих видов, в том числе в отношении метициллинрезистентного штамма *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкомицинрезистентного штамма *Leuconostoc mesenteroides*, полирезистентного штамма *Pseudomonas aeruginosa* и *Mycobacterium smegmatis* – теста для поиска противотуберкулезных средств. Высокий процент бактерий, проявляющих антимикробную активность, подтверждает целесообразность поиска продуцентов антибиотиков

среди представителей сложных микробных биоценозов.

Работа А.В. Якушева выполнена в рамках темы государственного задания "Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал", № 121040800174-6 и при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 075-15-2021-1396.

Список литературы

1. O'Neill J. The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations, 2016. Available at: http://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf.

2. Berdy, J. (2005) Bioactive Microbial Metabolites. The Journal of Antibiotics, 58, 1-26.

http://dx.doi.org/10.1038/ja.2005.1

3. Гаузе Г.Ф. Пути изыскания новых антибиотиков. Изд-во АН СССР, 1958, с. 171.

4. Hare, J.D. Ecology and management of the Colorado potato beetle. Annu. Rev. Entomol. 2003, 35(1), 81–100. doi:10.1146/annurev.en.35.010190.000501.

5. T.A. Efimenko, A.V. Yakushev, M.V. Demiankova, A.A. Glukhova, T.I. Khusnetdinova, V.S. Sadykova, O.V. Efremenkova. Antimicrobial activity of bacteria isolated from *Leptinotarsa decemlineata* and Solanum *tuberosum*. Annals of Environmental Science and Toxicology, 2022, 6(1): 097-119. DOI: https://dx.doi.org/10.17352/aest.000061.

6. Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics; Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 1991; pp. 115–147.

7. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 2016, 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054.

ФУНГИСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ Mn(II) С ФАРМАКОФОРНЫМИ ЛИГАНДАМИ, 1,10-ФЕНАНТРОЛИНОМ И ЕГО 1,10-ФЕНАНТРОЦИАНИНОВЫМИ (БИ-1,10-ФЕНАНТРОЛИЛЕНОВЫМИ) ПРОИЗВОДНЫМИ – БИОМИМЕТИКОВ ПРИРОДНЫХ ФЕРМЕНТОВ: КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Демидов В.Н.[1], Богомолова Е.В.[2], Иванова А.Г.[1], Ефимова Л.Н.[1], Вощиков В.И.[1], Пахомова Т.Б.[3]
[1]Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН, Санкт-Петербург
[2]Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург
[3]Санкт-Петербургский государственный технологический институт

Синтез новых координационных соединений переходных металлов с фармакофорными органическими, в том числе N-гетероциклическими, лигандами с целью последующего скрининга среди таких веществ перспективных фунгистатических и фунгицидных агентов, а также антимикотиков – металлолекарств, весьма актуален. Эта актуальность обусловлена приспособлением (адаптацией) грибов, микромицетов и грибных патогенов к действию существующих препаратов, что составляет существо известной проблемы резистентности микроорганизмов, бактерий и грибов по отношению к активным лекарственным агентам.

Для комплексов переходных металлов с N-гетероаренами L выделяются исследования катионных моноядерных [MLn]Xm и биядерных [LnM(μ-L)MLn]Xm соединений с 1,10-фенантролином и его производными L (μ-L – мостиковые фармакофорные лиганды) – это синтез и поиск среди них активных лекарственных противоопухолевых, антибактериальных и фунгицидных или фунгистатических агентов и антимикотиков (металлолекарств) [1, 2]. Такие исследования были начаты уже давно, а в настоящее время получены новые данные о весьма высокой биоактивности соединений данной группы, которая в ряде случаев сохраняется до нано- и пико-концентрационных уровней [3]. Чаще всего наиболее высокой биологической активностью обладают 1,10-фенантролиновые соединения Cu(II) и Cu(I) [4]. Однако поиск перспективных металлолекарств идет и среди 1,10-фенантролиновых комплексов Ag(I), Co(II), Cr(III) и Mn(II/III) [5, 6].

Как известно, для координационных соединений марганца

характерны разнообразные окислительные состояния +2, +3, +4 и возможны соответствующие редокс-переходы между ними. Комплексы Mn(II), Mn(III) и Mn(IV), в особенности биядерные, включающие фрагменты Mn2+(μ-L)Mn2+, Mn2+(μ-L)Mn3+, Mn3+(μ-L)Mn3+, Mn3+(μ-L)Mn4+, в последнее время изучаются как биомиметики природных антиоксидантных марганецсодержащих ферментов – каталазы и супероксиддисмутазы [7, 8]. Это связано в том числе и с тем, что подобные координационные соединения могут найти применение в лекарственной терапии, включая противоопухолевую [7].

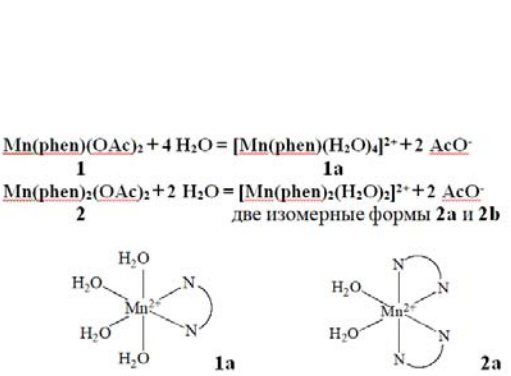
В настоящей работе синтезированы ацетатные моноядерные 1,10-фенантролиновые комплексы Mn(II) Mn(phen)n(OAc)2 (phen=1,10-фенантролин, n=1–3), 1–3, предшественники, и новые биядерные смешаннолигандные комплексы Mn(II) с мостиковыми фармакофорными 1,10-фенантроцианиновыми (би-1,10-фенантролиленовыми) лигандами μ-L [(phen)nMn2+(μ-PC)Mn2+(phen)n](OAc)4 (n=0 – 2), их пурпурно-фиолетовые стартовые формы и желто-коричневые редокс-производные [(phen)nMn2+(μ-PC')Mn2+(phen)n](OAc)4, 4–6.

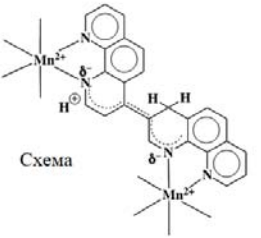
Синтез моноядерных соединений марганца(II) Mn(phen)n(OAc)2 (простых предшественников) осуществлен в растворах, исходя из тетрагидрата ацетата марганца(II) Mn(OAc)2•4H2O и моногидрата 1,10-фенантролина phen•H2O. Новые биядерные смешаннолигандные комплексы Mn(II) с мостиковыми фармакофорными 1,10-фенантроцианиновыми (би-1,10-фенантролиленовыми) лигандами μ-L [(phen)nM(μ-PC) M(phen)n](OAc)4 (n=0 – 2, пурпурно-фиолетовые стартовые формы) получены на основе CH-функционализации координированного 1,10-фенантролина в простых предшественниках с помощью металл-ассистируемого недегидрогенативного C(sp2) H-сочетания N-гетероаренов [9,10], ключевой промежуточной стадией которого является нуклеофильное гетероароматическое замещение водорода SNH [11]. Биядерные комплексы представляют собой наноразмерные структуры, в растворах ДМФА и ДМСО образующие полуколлоиды, и стеклообразные – в твердом состоянии. Полученные соединений 1–6 охарактеризованы данными ИК- и ЭСП-спектроскопии, термогравиметрии, измерения вязкости их растворов в воде, а также измерения электропроводности в воде и органических растворителях.

Согласно этим данным, структура хромофорного мостикового лиганда μ-PC, который входит в состав пурпурно-фиолетовых форм комплексов 4–6, представляет собой апоцианиновую ϖ-систему (схема).

Ацетатные моноядерные 1,10-фенантролиновые комплексы Mn(II) Mn(phen)n(OAc)2 1 и 2 (n=1 – 2) в водных растворах в результате

замещения ацетатных ионов молекулами воды равновесно переходят в максимально положительно заряженные катионные формы – октаэдрические комплексы:





Трис-хелат [Mn(phen)3](OAc)2 3 в водных растворах, будучи сильным электролитом, полностью диссоциирует с образованием катиона [Mn(phen)3]2+ и ацетатных анионов AcO-. В водном растворе трис-хелат присутствует в виде рацемической смеси двух оптических изомеров A и B:

Для того, чтобы перевести в водорастворимую форму пурпурно-фиолетовые биядерные наноразмерные 1,10-фенантроцианины (би-1,10-фенантролилены) Mn(II) [(phen)nMn2+(μ-PC')Mn2+(phen)n](OAc)4, n=0–2, 4–6, их предварительно растворяли в смеси ДМСО–HAcO (70 %), при этом пурпурно-фиолетовые формы переходят в интенсивно окрашенные редокс-производные желто-коричневые формы. После чего полученные желто-коричневые растворы разбавляли водой до необходимой концентрации растворенного вещества. Для водных растворов биядерных комплексов 4–6 мы предполагаем наличие процессов, протекающих с формированием аквакомплексных форм 4a и 5a, а также сложного комплексного дикатиона 6a:

$$\underset{\mathbf{4}}{Mn^{2+}(\mu\text{-}PC')Mn^{2+}(OAc)_4} + 8\ H_2O = \underset{\mathbf{4a}}{[(H_2O)_4Mn^{2+}(\mu\text{-}PC')Mn^{2+}(H_2O)_4]^{4+}} + 4\ AcO^-$$

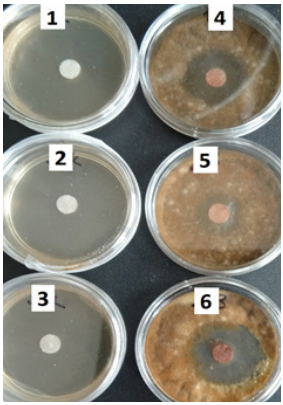
$$\underset{\mathbf{5}}{(phen)Mn^{2+}(\mu\text{-}PC')Mn^{2+}(phen)(OAc)_4} + 4\ H_2O = \underset{\mathbf{5a}}{[(H_2O)_2(phen)Mn^{2+}(\mu\text{-}PC')Mn^{2+}(phen)(H_2O)_2]^{4+}} + 4\ AcO^-$$

$$\underset{\mathbf{6}}{[(phen)_2Mn^{2+}(\mu\text{-}PC')Mn^{2+}(phen)_2](OAc)_4} = \underset{\mathbf{6a}}{[(phen)_2Mn^{2+}(\mu\text{-}PC')Mn^{2+}(phen)_2]^{4+}} + 4\ AcO^-$$

проводилось диско-диффузионным методом на чашках Петри с плотной питательной средой Сабуро. Чашки инокулировали спорами *Ulocladium sp.* по всей площади поверхности, после чего в центр помещали диски из фильтровальной бумаги, пропитанные растворами тестируемых соединений в концентрации 50 мг/мл. По диаметру зоны ингибирования роста грибов судили о фунгистатической активности вещества.

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) исследуемых соединений использовался стандартный метод серийных разведений в жидких средах в лунках микротитрационных планшетов (200 мкл) с добавлением в каждую лунку 10 мкл суспензии спор в концентрации 106 спор•мл-1, приготовленной на жидкой питательной среде. Исходная массовая концентрация соединений составляла 10 мг/мл. Планшеты инкубировали при 25 °С в течение 7 суток. По истечение указанного срока результаты учитывали под микроскопом.

Рис.1. Результаты тестирования фунгистатической активности комплексов 1–3 – моноядерные, 4–6 – биядерные.



Как показало исследование фунгистатической активности соединений 1–6 по отношению к грибам *Ulocladium sp.* (рис. 1), биологическое действие максимально в случае хорошо растворимых в воде моноядерных 1,10-фенантролиновых ацетатных комплексов 1–3. Для этих соединений МИК не превышала 19,5 мкг/мл. Фунгистатическая активность биядерных ацетатных 1,10-фенантроцианиновых (би-1,10-фенантролиленовых) комплексов Mn(II) 4–6

по отношению к грибам *Ulocladium sp.*ниже, чем у моноядерных ацетатных соединений 1–3, МИК варьировала в диапазоне 39-78 мкг/мл. Для сравнения, МИК флуконазола для данного штамма *Ulocladium sp.* составила 62,5 мкг/мл.

Полученные результаты, скорее всего, объясняются тем, что малые размеры (по сравнению с биядерными комплексами) катионных форм моноядерных 1,10-фенантролиновых соединений приводят к высокой проницаемости по отношению к ним клеточных и ядерных мембран и, соответственно, к их высокой биодоступности и биоактивности. В качестве одного из биофизических механизмов фунгистатического действия следует рассмотреть взаимодействие 1–3 с макромолекулами ДНК, возможно по типу интеркалирования ДНК – встраивания плоскостей координированного 1,10-фенантролина между витками двойной спирали ДНК за счет невалентных ϖ–ϖ-стекинговых межмолекулярных взаимодействий, что характерно для 1,10-фенантролиновых соединений переходных металлов [12]. При этом изомерная форма 2b должна быть наиболее склонна к интеркалированию в ДНК, вследствие выгодного пространственного расположения двух 1,10-фенантролиновых циклов, находящихся практически в одной плоскости.

Работа была выполнена в ИХС РАН в рамках темы государственного бюджета: «Физико-химические основы неорганического синтеза микро- и наноструктурированных неорганических, органо-неорганических и керамических материалов и покрытий для био-, энерго- и ресурсосберегающих технологий» (1021050501070-0-1.4.3, № 0097-2022-0006)); а также в БИН РАН, тема государственного бюджета: «Биоразнообразие, экологические, структурные и функциональные особенности грибов и грибоподобных протистов» (122011900033-4).

Список литературы

1. Viganor L., Howe O., Mc Carron P., at al. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2017. 17 (11). P. 1280-1302.

2. Frei A., Zuegg J., Elliott A.G., at al. Chem. Sci. 2020. V. 11 (10). P. 2627–2639.

3. Kellett A., O'Connor M., McCann M., at al. Med. Chem. Commun. 2011. V. 2. P. 579-584.

4. Masuri S., Va hara P., Cabiddu M.G., at al. Molecules. 2021 V. 27(1). P. 49.

5. Gandra R.M., McCarron P., Viganor L., at al. Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 470. P. 1-15.

6. McCarron P., McCann M., Devereux M., at al. Front. Microbiol. 02 July

2018. Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy. 10 p.

7. Мельникова Н.Б., Соловьева О.Н., Кочетков Е.Н. Изв. высш. учеб. зав. Сер. «Химия и химич. технол.». 2019. Т 62 (10). С. 4-29.

8. Ibrahim Kani, zlem Atlier, Kiymet G ven. J. Chem. Sci. 2016. V. 128. P. 523-536.

9. Демидов В.Н. Автореф. дисс… докт. хим. наук, Санкт-Петербург, СПб ГТИ (ТУ), 2010.

10. Демидов В.Н., Симанова С.А., Савинова А.И., Пахомова Т.Б. Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. 2009. Т. 53. № 1. С. 128-134.

11. Charushin V.N., Chupakhin O.N. Top. Heterocycl. Chem. 2014. Vol. 37. P. 1-50.

12. Demidov V.N., Kas'yanenko N.A., Antonov V.S., at al. Russ. J. Gen. Chem. 2012. V. 82. P. 602–620.

ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОЗИЦИОННОГО ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «ДЕКОНДЕЗ»

Ишков Ю.Н., Жаркова О.А., Пудова О.Б., Петрова А.П.
Государственный НИИ биологического приборостроения, Москва

Несмотря на существование огромного количества используемых в практике дезинфицирующих средств, поиск новых высокоактивных композиций обладающих антибактериальной активностью остается по-прежнему актуальным. Это связано, прежде всего, с увеличением числа микроорганизмов с приобретенной лекарственной устойчивостью к применяемым традиционным антибактериальным агентам. Исследования по поиску эффективных дезинфицирующих средств направлены как на разработку и синтез новых молекул, обладающих противомикробными свойствами, так и на создание комбинаций уже известных биоцидных дезинфектантов. Комбинированные антибактериальные композиции оказывают эффективное воздействие на микроорганизмы за счет синергических эффектов, возникающих при сочетании химических дезинфектанов. При совместном механизме действием одного из комбинации дезинфектанотов нейтрализуется система защиты микробной клетки, после чего второй дезинфектант получает практически беспрепятственный доступ к основным мишеням и, взаимодействуя с ними, инактивирует клетку. Воздействие комбинации дезинфектанотов крайне эффективно и сточки зрения инактивации устойчивых к определенному виду дезинфектанта микроорганизмов.

Основываясь на знаниях синергетического действия комбинаций различных групп дезинфектантов, специалисты ФГУП «ГосНИИБП» разработали средство «ДеконДез» с широким спектром антимикробной активности: фунгицидной, бактерицидной, туберкулоцидной, вирулицидной. Высокая антимикробная активность средства «ДеконДез» обусловлена синергизмом компонентов, относящихся к трем классам химических дезинфектантов – пероксидов, спиртов и кислот. Основным действующим веществом нового средства является пероксид водорода, который оказывает губительное воздействие на широкий спектр микроорганизмов - грибы, грамположительные и грамотрицательные бактерии, вирусы и споры. Дополнительно, пероксид водорода активирован салициловой кислотой, которая сама является антимикробным компонентом. В данном составе салициловая кислота также используется в качестве регулятора водородного показателя pH для создания близкого к нейтральному значения pH, а также для стабилизации пероксида водорода. Также в состав дезинфицирующей композиции в качестве дополнительного действующего вещества (синергетика пероксида водорода) введен изопропиловый спирт, который как полярный дезинфектант, содержащий гидрофильные и лиофильные группы, способен растворять фрагменты клеточных структур-мембран, нарушая их целостность. В состав дезинфицирующей композиции также введены функциональные добавки, улучшающие эксплуатационные свойства средства.

Во ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора проведены лабораторно-экспериментальные исследования обеззараживающей активности разработанного средства «ДеконДез» в отношении микроорганизмов различной этиологии, в том числе в отношении патогенных грибов. В качестве тест-микроорганизмов использовали:

- *Candida albicans* (шт. ВКПМ Y 3108 (ATCC 10231) - для оценки фунгицидной активности в отношении возбудителей кандидозов;

- *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* F-1207 - для оценки фунгицидной активности в отношении возбудителей дерматофитий.

Эффективность обеззараживания различных объектов оценивали в соответствии с требованиями Руководства Р 4.2.3676-20 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности», 2020 г.

Результаты испытаний представлены в таблицах 1-2.

Таблица 1. Определение спектра антимикробного действия дезинфицирующего средства «ДеконДез» (метод батистовых тест-объектов).

Тест-штаммы	Повторности опыта	Время обеззараживания, минуты					Контроль
		30 сек	1	3	3	30	
Candida albicans ATCC 10231	1	р	н/р	н/р	н/р	н/р	р
	2	р	н/р	н/р	н/р	н/р	р
	3	р	н/р	н/р	н/р	н/р	р
Trichophyton mentagrophytes var. *gypseum* F-1207	1	р	р	н/р	н/р	н/р	р
	2	р	р	н/р	н/р	н/р	р
	3	р	р	н/р	н/р	н/р	р

Примечание: «н/р» - отсутствие роста.

Из таблицы 1 следует, что помощью метода батистовых-тест объектов подтверждена фунгицидная активность средства «ДеконДез» в отношении тест-штаммов *Candida albicans* ATCC 10231 и *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* F-1207. Установлено, что гибель тест-штамма *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* F-1207 наступает по истечении 3 минуты, а гибель тест-штамма *Candida albicans* ATCC 10231 наблюдается по истечении 1 минуты.

По результатам микробиологических исследований установлено, что средство «ДеконДез» обладает фунгицидной активностью в отношении патогенных грибов рода Кандида и Трихофитон, так как эффективно обеззараживает тест-объекты, контаминированные *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* F-1207 и *Candida albicans* ATCC 10231 при времени обеззараживания 2 и 1 минуты соответственно. На основании полученных данных разработана Инструкция №01/22 по применению средства дезинфицирующего «ДеконДез» содержащая режимы дезинфекции объектов, контаминированных микроорганизмами различной этиологии.

Средство «ДеконДез» по параметрам острой токсичности при введении в желудок и нанесении на кожу, в соответствии с классификацией ГОСТ 12.1.007-76, относится к 4 классу мало опасных веществ. Местно-раздражающие, кожно-резорбтивные

и сенсибилизирующие свойства в рекомендованных режимах применения у средства не выражены. Кумулятивный эффект отсутствует. Средство обладает умеренным раздражающим действием на слизистые оболочки глаза. По степени ингаляционной опасности в рекомендуемых режимах применения средство относится к 4 классу малоопасных веществ.

Таблица 2. Оценка фунгицидной активности дезинфицирующего средства «ДеконДез» при обеззараживании тест-поверхностей.

Тест-объект	Время обеззараживания, минуты	КОЕ (питательная среда ГРМ №2)	Способ обеззараживания
		Candida albicans ATCC 10231	
линолеум	1	0;0;0	Орошение
неокрашенное дерево		0;0;0	
металл		0;0;0	
пластик		0;0;0	
стекло		0;0;0	
кожа искусственная		0;0;0	
кожа натуральная		0;0;0	
резина		0;0;0	
Контроль		$(1,5\pm0,1)\cdot10^6$ КОЕ/мл	
		Trichophyton mentagrophytes var. gypseum F-1207	
линолеум	2	0;0;0	
неокрашенное дерево		0;0;0	
металл		0;0;0	
пластик		0;0;0	
стекло		0;0;0	
кожа искусственная		0;0;0	
кожа натуральная		0;0;0	
резина		0;0;0	
Контроль		$(2,4\pm0,1)\cdot10^6$ КОЕ/мл	

Дезинфицирующее средство «ДеконДез» прошло дезинфектологическую экспертизу, в результате чего получено Свидетельство о государственной регистрации (RU.77.99.88.002.E.000469.02.22 от 14.02.2022 г.) в Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

ОЦЕНКА ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ И ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Хараева З.Ф., Барокова Е.Б., Куйгенова Ф.Х., Эштрекова Э.А.
Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, Нальчик

Использование антибактериальных средств для лечения бактериальных инфекций может стать причиной развития дисбактериоза – первичного фактора развития кандидоза. Кроме того, многие штаммы бактерий обладают устойчивостью к антибактериальным препаратам. В связи с этим, поиск материалов, к которым нет резистентности у микробов, и не нарушающих нормальную микрофлору является актуальным. В качестве таких материалов можно рассмотреть различные серебросодержащие фармацевтические препараты и эфирные масла [1-3].

Цель исследования: оценка противогрибковой эффективности различных серебросодержащих фармацевтических препаратов и эфирных масел в отношении разных штаммов *Candida albicans* in vitro.

Материалы и методы исследования. Для исследования были выбраны различные серебросодержащие препараты: Колларгол, Протаргол, (экстемпоральный), Протаргол (ООО «Фармновация»), НанАргол, Сиалор, Аргосульфан. В работе была исследована антигрибковая активность эфирных масел розмарина, чайного дерева, лаванды, эвкалипта, кедра и можжевельника. Для оценки противогрибковой эффективности были взяты образцы музейных штаммов *Candida albicans* (музей культур кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии КБГУ им. Х.М. Бербекова). Чашки Петри с мясопептонным агаром делили на сектора и 1 мл выращенной жидкой грибковой культуры наносили на её поверхность, остаток удаляли пипеткой. После подсыхания на соответствующий сектор микробиологической петлей наносили исследуемые образцы. Результаты отмечали спустя 24 часа инкубации при 37оС. Все эксперименты производились в дублях. Статистическую обработку проводили стандартными методами.

В результате проведенных исследований установлено, что из всех исследованных образцов эфирных масел противогрибковым свойством обладает масло чайного дерева. Препараты колларгол, протаргол (ООО «Фармновация») и Нанаргол, имеющие в своем составе соединения серебра, не обладают противогрибковой активностью. Из исследуемых

образцов наибольшей противогрибковой эффективностью обладает Протаргол (экстемпоральный).

Выводы. Протаргол (экстемпоральный), Сиалор и Аргосульфан проявляют антибактериальную и противогрибковую активность в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Наиболее высокий противогрибковый эффект в отношении исследуемых штаммов у препарата Протаргол (экстемпоральный). Из эфирных масел, которые были использованы в данном исследовании, только масло чайного дерева обладает противогрибковой активностью.

Работа проведена при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, мнемокод FZZR-2023-0005.

Список литературы

1. Георгиева-Андреева М., Енчев С. Исследование антигрибного действия эфирных масел чайного дерева (melaleuca alternifolia), шалфея (*Salvia officinalis*) и эвкалипта (eucalyptus globulus) на гриб *Alternaria ssp.*, изолированного из стевии (stevia rebaudiana)» // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2013. Вып. 3. С.132-137.

2. Букина Ю.А., Сергеевна Е.А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра // Биохимия и биотехнология. 2012. №14. С.170-172.

3. Еремеева К.В., Петрова Е.И., Свистушкин В.М. Протеинат серебра в ЛОР-практике: новое – это хорошо забытое старое? // РМЖ. 2015. №23. С.1381-1383.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИКАТИОНОВ НА МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ

Куликов С.Н.1,2, Хайруллин Р.З.1

[1]Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора

[2]Казанский федеральный университет

Грибы способны вызывать заболевания известные как микозы. Среди них особую группу составляют патогенные плесневые грибы, вызывающих разнообразные поражения. Обычно они вызывают поражения у лиц с серьёзными нарушениями иммунитета. В настоящее время многочисленными исследованиями показано значение микогенной сенсибилизации в патогенезе аллергического

ринита, бронхиальной астмы, аллергических бронхолёгочных микозов, экзогенного аллергического альвеолита и атопического дерматита [1-3]. Причиной возникновения аллергических реакций считаются антигенные компоненты, находящиеся на поверхности спор и в составе клеточных стенок, имеющие гликопротеидную природу. Именно поэтому важнейшим источником аллергенов являются мицелиальные грибы, которые образуют споры, легко распространяющиеся в воздушной среде [4].

Несмотря на то, что для борьбы с грибами успешно используется большое количество антимикотиков, разработка новых форм препаратов сохраняет свою актуальность и в настоящее время. Одним из таких веществ является хитозан - биогенный полимер, состоящий из остатков глюкозамина и ацетилглюкозамина [5].

Многочисленные исследования биоцидной активности хитозана в основном сосредоточены на изучении его антибактериальных свойств и антимикотической активности в отношении дрожжевых и дрожжеподобных грибов, тогда как действие хитозана на мицелиальные грибы изучено гораздо в меньшей степени [6, 7].

В связи с вышесказанным, целью данного исследования являлась оценка потенциальной антимикотической активности хитозана в отношении мицелиальных грибов.

В работе использовали штаммы следующих мицелиальных грибов: *Penicillium tardum*, *Penicillium chrizogenum*, *Penicillium crustozum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Phoma betae*, *Cladosporium herbarum*, *Mucor pusillus*, *Trichoderma harzianum* из музея КНИИЭМ. Штаммы грибов поддерживались на агаризованной среде Сабуро.

В работе использовали низкомолекулярный хитозан, полученный с помощью кислотной деполимеризации, со средневесовой молекулярной массой 8,3 кДа, аналогичный используемому в работе [6]. Раствор хитозана стерилизовали посредством фильтрации через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм.

Противогрибное действие хитозана исследовали в жидкой среде Сабуро при pH 5,5-5,7. Для этого в среду добавляли раствор хитозана до конечной концентрации 500 мкг/мл. Затем вносили свежеприготовленную суспензию спор грибов в той же среде до конечной концентрации 1-2,5 105 спор на 1 мл. После 7 суток инкубации при 30°С оценивали рост культуры и проводили микроскопический анализ.

Было показано, что хитозан в концентрации 500 мкг/мл практически

полностью ингибировал рост *P. tardum*, *P. chrizogenum*, *A. flavus*, *P. betae* и *C. herbarum* (рис. 1). Рост остальных видов микромицетов полностью не подавлялся, однако были отмечены заметные изменения в количестве биомассы, обилии спороношения, цвете культуры и культуральной жидкости. Так, *P. crustozum* в присутствии хитозана не образовывал сплошного мицелиального образования на поверхности питательной среды, культуральная среда в отличие от контрольного варианта не приобретало характерную красно-коричневую окраску. *A. fumigatus* в обоих вариантах имел обильное спороношение, хотя в опыте было отмечено более позднее начало спороношения и меньшее количество биомассы. Аналогичный результат наблюдался и в случае с другим аспергиллом - *A. niger*, а также мукором и триходермой.

Поскольку *A. flavus* даже в контрольном варианте через 7 суток показывал незначительный рост, было проведено изучение ингибирующего действия хитозанового полимера на этот микромицет на агаризованной питательной среде того же состава с такой же концентрацией исследуемого вещества. Было обнаружено, что на 7 сутки роста колонии, мицелий гриба по морфологии и характеру роста заметно отличается от контрольного при добавлении в среду хитозана. Нити мицелия укорачивались по длине и утолщались в диаметре, имели неровную структуру, благодаря чему колония приобретала более плотный вид (рис. 1), а сами колонии на твёрдой питательной среде были меньшего размера. Аналогичный эффект изменения морфологии мицелия наблюдался в варианте с *P. crustozum* (рис. 2).

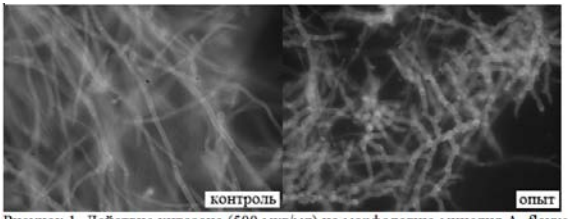


Рисунок 1. Действие хитозана (500 мкг/мл) на морфологию мицелия A. flavus.

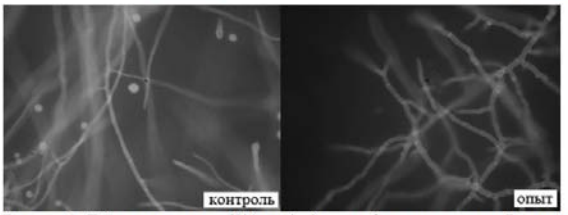


Рисунок 2. Действие хитозана (500 мкг/мл) на морфологию мицелия P. crustozum.

Таким образом, показано, что низкомолекулярный хитозан ингибирует рост ряда мицелиальных грибов имеющих медицинское значение. Полученные результаты указывают на обоснованность проведения дальнейших исследований по выяснению механизма фунгицидного действия полимера на молекулярном уровне с целью создания на их основе препаратов антимикотической направленности.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Список литературы

1. Kurup V.P., Shen H.-D., Vijay H. Immunobiology of fungal allergens. In*t. A*rch. Allergy Immunol., 2002, v. 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, v. 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 environmen*t. A*llergy, 2000, v. 55, № 12, p. 1190 - 1193.

4. 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.

5. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. - М.: Изд-во Наука, 2002. - 368 с.

6. Куликов С.Н., Лисовская С.А., Глушко Н.И., Левов А.Н., Лопатин С.А., Варламов В.П. Действие низкомолекулярного хитозана в отношении *Candida albicans*. Практическая Медицина, 2009, № 3 (35), с. 69 - 71.

7. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Варламов В.П. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизмы действия и роль структуры. Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунобиологии, 2009, № 5, с. 91 - 97.

АНТИМИКОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АМФИФИЛЬНЫХ ДИСПЕРСИЙ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ КОБАЛЬТА И ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА

Кутырева М.П.[1], Россова А.А.[1,3], Халдеева Е.В.[1,2], Ханнанов А.А.[1]
[1]Казанский (Приволжский) федеральный университет
[2]Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора
[3]ФИЦ Казанский научный центр РАН

Большинство терапевтических подходов к лечению широкого спектра микозов различной этиологии и взаимосвязанных с ними социально значимых заболеваний или вирусных инфекций опираются на использование лекарственных средств (ЛС). Однако, несмотря на значительное количество фармацевтических препаратов различной природы и состава, существует ряд нерешенных проблем, препятствующих их эффективному применению. К основным проблемам относятся, во-первых, различные ограничения режима дозирования, нежелательные побочные эффекты в обычной лекарственной форме, неблагоприятные физико-химические и фармакокинетические свойства и, как следствие, низкая биодоступность и эффективность большинства антимикотических ЛС. Во-вторых, проблема расширения списка резистентных к антибиотикам штаммов микроорганизмов представляет по данным ВОЗ серьезную опасность практически в каждом регионе мира. Научно-практические исследования для решения обозначенных проблем узкоспецифичны и, как правило, направлены на решение задачи повышения биодоступности конкретного ЛС с помощью наноносителей. Одним из подходов в этом направлении является создание системы доставки на основе наночастиц благородных металлов серебра и золота, в которых металлическая нанофаза выполняет роль носителя векторных групп или фармсубстанций [1]. В настоящий момент ряд мировых производителей лекарственных средств завершают прохождение клинических испытаний препаратов на основе металлических наночастиц, а именно: Feridex® (Bayer 104 Healthcare), Resovist® (Bayer Healthcare), Combidex® (AMAG Pharma), Sinerem® 105 (Guerbet), Clariscan® (Nycomed), VSOP C184 (Ferropharm).

Однако, эти исследования не снимают с повестки дня основную проблему современного мирового сообщества - проблему антибиотикорезистентности. Пандемия COVID-19 и последующие события значительно усугубили ситуацию по смертности пациентов в условиях распространения форм микроорганизмов, в том числе возбудителей инфекционных заболеваний с генетическими

особенностями, определяющими устойчивость к противомикробным ЛС.

Значимой стратегией для решения данной задачи является использование наноматериалов, содержащих металлические наночастицы (МНЧ) с антимикробной/ антимикотической активностью [2-7]. Характеристики морфологии (размер, химический состав и организованность нанофазы) определяют эффективность и токсикологические характеристики наноматериала. Не менее важным для практического применения фактором является агрегатное состояние МНЧ. Наиболее успешны для применения в биомедицине коллоидно устойчивые металлосодержащие наносистемы. Для обеспечения коллоидной устойчивости МНЧ используют два подхода: синтез коллоидных МНЧ в среде соединений – стабилизаторов и солюбилизация порошковых МНЧ с помощью поверхностно активных веществ или полимеров. Второй подход позволяет одновременно обеспечить солюбилизацию МНЧ в высокой концентрации, от которой существенно зависит их терапевтическая эффективность, и создать амфифильную наносистему с улучшенными характеристиками биодоступности.

Настоящая работа направлена на создание и исследование новых нанодисперсий на основе МНЧ, солюбилизированных в среде поверхностно активного вещества и оценку их антимикотической активности.

В качестве металлической нанофазы использовали порошковые наночастицы кобальта Co-НЧ, синтезированные ранее по методике [8], представляющие собой в твердой фазе сфероидные частицы с диаметром d=15-50 нм. Синтезировано три образца наночастиц Co-НЧ1, Co-НЧ2, Co-НЧ3. В качестве солюбилизирующего агента использовали неионогенное поверхностно активное вещество Triton X-100 (4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенил-полиэтиленгликоль Triton X-100 (ТХ-100) (t-Oct-C6H4-(OCH2CH2)9,5OH, M=625 г моль-1, CAS 9002-93-1, MDL MFCD00128254, ККМ 2 10-4 моль л-1, Ткип=65 0C, (Sigma-Aldrich). Установлено, что устойчивые дисперсии Co-НЧ/ТХ-100 формируются при концентрации сурфактанта ТХ-100 не ниже 5 10-4 моль л-1. Получены три амфифильные дисперсии: Co-НЧ1/ТХ-100, Co-НЧ2/ТХ-100, Co-НЧ3/ТХ-100.

Так как активность дисперсий на основе синтезированных МНЧ и ТХ-100 должна быть исследована в биосредах, методом анализа тареториий частиц (Nanoparticle tracking analysis – NTA [9]) оценена величина гидродинамического диаметра частиц Co-НЧ и их концентрация в воде до и после солюбилизации ТХ-100 (табл. 1).

Таблица 1. Данные NTA – анализа распределения частиц в дисперсных наносистемах Co-НЧ и Co-НЧ/ ТХ-100: средний гидродинамический диаметр (Dhmean), гидродинамический диаметр основной фракции частиц (Dhmode), общая концентрация частиц (Ctotal), массовая доля частиц основной фракции mode =Cmode/Ctotal.

Соединение	D^h_{mean}, нм	D^h_{mode}, нм	C_{total}, частиц/мл	$_{mode}$
Co-НЧ1	92±3	85±3	(0.10±0.02) 10^8	0.99
Co-НЧ2	161±6	114±8	(0.68±0.08) 10^8	0.65
Co-НЧ3	142±9	110.0±9	(2.42±0.52) 10^8	0.77
Co-НЧ1/ТХ-100	132±1	97±4	(2.85±0.20) 10^8	0.72
Co-НЧ2/ТХ-100	175±7	124±10	(12.93±0.63) 10^8	0.85
Co-НЧ3/ТХ-100	127±8	102±13	(6.06±1.15) 10^8	0.92

Проведены скрининговые испытания по определению фунгицидных свойств серии дисперсий Co-НЧ и Co-НЧ/ТХ-100 (таблица 2) В работе использовали штаммы культур: *Candida albicans* АТСС – 885653, *Candida albicans* РКПГ, *Cryptococcus laurentii*, *Aspergillus fumigatus* РКПГ, *Aspergillus fumigatus* F753, *Aspergillus niger* F1119.

Таблица 2. Антимикробная активность дисперсий Co-НЧ и Co-НЧ/ ТХ-100.

Соединение	Зона задержки роста, d (мм)					
	Candida albicans АТСС	*Candida albicans* РКПГ	*Cryptococcus laurentii*	*Aspergillus fumigatus* РКПГ	*Aspergillus fumigatus F753*	*Aspergillus niger F1119*
Co-НЧ1	30	25	20	28	15	27
Co-НЧ2	25	20	-	7	12	12
Co-НЧ3	15	20	10	-	-	-
Co-НЧ1/ТХ-100	15	5	-	-	-	-
Co-НЧ2/ТХ-100	-	12	-	-	-	-
Co-НЧ3/ТХ-100	20	20	13	18	10	15
ТХ-100	-	-	-	-	-	-

По данным таблицы 2 образцы Co-НЧ1, Co-НЧ2 и Co-НЧ2 успешно проявляют антимикотическую активность в отношении *Candida*

albicans. В отношении культур *Cryptococcus laurentii*, *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus niger* активны только частицы Co-НЧ1, обладающие наименьшим гидродинамическим диаметром 92±3 нм и высокой монодисперсностью (mode = 0.99).

Переход к амфифильным дисперсиям Co-НЧ/ТХ-100 сопровождается выраженной специфичностью действия по отношению к культурам *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus niger* для дисперсии Co-НЧ3/ТХ-100 с концентрацией частиц (6.06±1.15) 108 частиц/мл, высокой монодисперсностью (mode = 0.92) и малым средним гидродинамическим диаметром 127±8 нм.

Полученные экспериментальные данные могут быть использованы для разработки адаптивных форм антимикотических препаратов с различной специфичноностью на основе амфифильных дисперсных систем, включающих наночастицы металлов и поверхностно активные вещества. Данные наносистемы в дальнейшем могут быть позиционириованы для повышения терапевтической эффективности и обеспечения комплексной активности лекарственных препаратов, а также создания компонентов альтернативных методов лечения.

Список литературы

1. Chandrakala, V. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems /V. Chandrakala, V. Aruna, G. Angajala // Emergent Materials.- 2022.- V. 5.- P.1593–1615

2. Ramya, V. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties / V. Ramya, N. Beena // Current Research in Green and Sustainable Chemistry. – 2021. – V. 4. - Article number 100205

3. Jalab, J. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of Acacia cyanophylla and its antibacterial activity / J. Jalab, W. Abdelwahed, A. Kitaz, R. Al-Kayali // Heliyon. – 2021. – V. 7. - Article number e08033

4. Gomes, H. I. O. Silver Nanoparticles as Carriers of Anticancer Drugs for Efficient Target Treatment of Cancer Cells / H. I. O. Gomes, C. S. M. Martins, J. A. V. Silver // Nanomaterials. – 2021. – V. 11. – P. 964.

5. Кричевский, Г. Е. Нанотехнологии и наночастицы металлов на службе медицины и других областей науки и техники / Г. Е. Кричевский // НБИКС-Наука. Технологии. – 2020. – Т. 12. - № 4. – С. 32–57.

6. Sonia *S. e*t al. Synthesis of hierarchical CuO nanostructures: Biocompatible antibacterial agents for Gram-positive and Gram-negative bacteria //Current Applied Physics. – 2016. – Т. 16. – №. 8. – С. 914-921.

7. Xu X. et al. Doping engineering and functionalization of iron oxide nanoclusters for biomedical applications //Journal of Alloys and Compounds.

– 2022. – С. 166459.

8. Khannanov A.A. Superparamagnetic Cobalt Nanoparticles in Hyperbranched Polyester Polyol matrix with Anti-Protease Activity / A.A. Khannanov, A.A. Rossova, K.A. Ignatyeva, N.A. Ulakhovich, A.V. Gerasimov, A.E. Boldyrev, V.G. Evtugyn, A.*M. R*ogov, M.A. Cherosov, I.F. Gilmutdinov, M.P. Kutyreva //Journal of Magnetism and Magnetic Materials (Q2) – 2022.- V.547.- Article number 168808.

9. Malloy, A. Nanoparticle tracking analysis - The halo™ system / A. Malloy, B. Carr / Particle and Particle Systems Characterization. 2006. Т. 23, № 2. С. 197-204.

АНТИГРИБНАЯ АКТИВНОСТЬ БИНОРАМА™ IN VITRO

Панчук С.В.[1], Игнатов А.Н.[2]

[1]ФНЦ овощеводства, Лесной городок

[2]РУДН, Москва

Введение

Большинство биофунгицидных штаммов бактерий, применяемых для защиты растений, включая антагонисты рода *Pseudomonas*, подавляют популяцию патогенов благодаря антагонистической активности, конкуренции за питательные вещества и индуцированной системной резистентности растений. Ингибирование роста грибов бактериями этого рода вызвано выделением различных антибиотиков, среди которых известны феназин-1-к арбоновая кислота, и другие [1]. Помимо антибиотиков важную роль в ингибировании играют выделяемые бактериями этого рода сидерофоры – соединения, осуществляющие транспорт железа. Связывая ионы трехвалентного железа и образуя с ним стабильные комплексы, сидерофоры лишают грибов необходимого элемента питания, что приводит к приостановке развития последних [2]. Продукция антибиотиков группы феназинов [2] характерна для бактерий родов *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Methanosarcina*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Sorangium*, *Streptomyces*, *Xanthomonas* и некоторых глубоководных морских микроорганизмов [4]. Но наиболее перспективными продуцентами антибиотиков считаются представители рода *Pseudomonas* [1]. Цель исследования – анализ спектра антигрибной активности биопрепарата Бинорам, в состав которого входят три штамма *Pseudomonas fluorescens* - 7G, 7G2K и 17-2.

Материалы и методы

Основными объектами исследования служили штаммы *Fusarium*

oxysporum, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* и *Cladosporium fulvum* из коллекции департамента агробиотехнологии РУДН и коммерческий препарат Бинорам, предоставленный производителем – ООО ЭкоПлант Агро непосредственно перед проведением опытов. Все штаммы грибов хранили на стерильном зерне при температуре -20оС, и выращивали на овсяном агаре за три недели до постановки экспериментов. Для определения эффективности Бинорама, грибы выращивали на среде Сабуро [5]. Для определения анти-грибной активности, аликвоты (5 мкл) препарата Бинорам в исходной концентрации (2,5 *109 КОЕ/мл) наносили при помощи стерильного аппликатора на поверхность агаризованной среды «кольцом» с диаметром 5 см и инкубировали в течении 72 часов при 28оС [4] для роста бактерий и синтеза активных веществ. Культуры тест-объектов в виде агаровых блоков, вырезанных по периметру колоний грибов с фрагментами мицелия (диаметр 10 мм), размещали по центру чашек Петри. В качестве контроля использовали чашки с тест-объектами без Бинорама. Диаметр колоний грибов измеряли (в см) каждые 24 часа, начиная с 4-го дня после начала опыта. Процент ингибирования роста колоний грибов определяли по формуле: уровень ингибирования роста культуры, % = 100* (диаметр колонии в контроле - диаметр колонии в опыте)/ диаметр колонии в контроле. Фунгицидное или фунгистатическое действие препарата оценивали по наличию/отсутствию роста грибов после их пересева на среду Сабуро без Бинорама: в случае отсутствия роста грибов действие биофунгицида оценивалось как фунгицидное, а при возобновлении роста – как фунгистатическое. Все эксперименты проводили в 6 повторениях. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 12.0 методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Полученные результаты представляли в виде среднего арифметического, ошибки опыта и достоверности различий между вариантами по критерию Дункана при уровне значимости $p \leq 0,05$ [6] (Таблица 1).

Результаты и обсуждение

Из представленных данных (Таблица 1) видно, что Бинорам существенно подавляет рост большинства изученных грибов. Исключение составляют штаммы *Alternaria alternata*, у которых наблюдается задержка роста. Для всех тест-объектов был показан фунгистатический эффект. Слабо выраженный фунгицидный эффект Бинорама в отношении грибных тест-объектов, может быть

вызван недостаточной концентрацией действующих веществ или их низкой растворимостью/диффузией в агаре. Следует отметить, что восприимчивость фитопатогенов к применению Бинорама в качестве биоагента для защиты растений не всегда коррелирует с эффективностью препарата in vitro. Наблюдаемые отличия могут быть вызваны различным качественным и количественным составом антимикробных метаболитов, продуцируемых штаммами в почве, на растении и в питательной среде. Дальнейший функциональный анализ состава антигрибных веществ в составе Бинорама должен прояснить данную ситуацию. В целом, полученные данные соответствуют выше указанным механизмам действия биоагентов, однако, учитывая слабую фунгицидность препарата, механизм конкуренции является основным. Таким образом, нами показано, что Бинорам проявляет широкий спектр антагонистического действия на фитопатогенные грибы – возбудители различных заболеваний растений.

Таблица 1. Ингибирование роста колоний фитопатогенных грибов препаратом Бинорам на среде Сабуро.

Вид	Штамм	Среднее ингибирование, %	Группа с достоверными различиями по критерию Дункана [6]
Fusarium oxysporum	F12	69,43	A
	F28	51,56	AB
Botrytis cinerea	BC23	52,92	AB
	BC102	45,93	B
Alternaria alternata	AL-M	27,10	CD
	AL-01	13,26	D
Cladosporium fulvum	CF02	35,93	C
	CF09	42,12	BC
	CF12	34,70	C
Ошибка среднего		2,51	-

Список литературы

1. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. 264 с

2. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В., Томилова О.Г. Биопрепараты в защите растений Новосибирск, 2000. 128 с.

3. Munita, J. Mechanisms of Antibiotic Resistance / J. Munita, C. Arias // Microbiol. Spectr. – 2016. – Vol. 5. – P. 481–511.

4. Rao, Y. M. Oxidative-stress-induced production of pyocyanin by *Xanthomonas campestris* and its effect on the *indica*tor target organism, *Escherichia coli* / Y. *M. R*ao, G. K. Sureshkumar // J. Industr. Microbiol. Biotech. – 2000. – Vol. 25. – P. 266–272.

5. Методы почвенной микробиологии / под ред. Г. С. Муромцева. –М. : Колос, 1983. – 252 с.

6. Duncan, David B. "Multiple range and multiple F tests." biometrics 11.1 (1955): 1-42.

ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И ГИДРОЛАТОВ МОНАРДЫ. ЧАБРЕЦА И ЧАБЕРА ГОРНОГО НА РОСТ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

Постникова О.Н.

Крымский Федеральный Университет, Симферополь

Среди орфанных заболеваний муковисцидоз (МВ) - самое распространенное. Носителем дефектного гена является примерно каждый 20-й житель планеты, а если эти гены обнаруживаются у обоих родителей, то вероятность рождения больного ребенка составляет 25%. Пока в России зарегистрирован только один таргетный препарат …МВ, поэтому лечение, в основном, симптоматическое, при котором продолжительность жизни, как правило, составляет чуть больше 20 лет.

Людям с муковисцидозом, чтобы поддерживать нормальное состояние, нужны постоянные ингаляции лекарств, разжижающих мокроту, а также антибиотики и другие препараты. Кроме того, у каждого больного происходят периоды обострения заболевания. Так, 15% пациентов госпитализируются как минимум один раз в год. Инфекции могут привести к прогрессирующим нарушениям в работе легких, развитию дыхательной недостаточности.

Особенностью инфекции у больных муковисцидозом (МВ) является

персистенция ассоциаций микроорганизмов, включающих от 2-3 до 5 видов [1]. Прогноз течения МВ зависит от тяжести поражения органов дыхания и развития инфекционных осложнений, вызванных условно-патогенными микроорганизмами. Среди них важную роль играют грибы рода *Candida*, которые выделяются у 35,9% амбулаторныых и 60% госпитализированных пациентов. Реже выделяются грибы *Aspergillus fumigatus* [2].

Гидролаты - водная фракция эфирных масел, которая образуется при их получении из растений методом водно-паровой дистилляции. Они содержат все основные компоненты эфирных масел, обладают высокой биологической активностью и выраженными антимикробными свойствами[3,4,5]. Гидролаты некоторых масел также снижают вязкость мокроты.

Целью работы являлось изучение действия эфирных масел и их гидролатов на рост изолятов дрожжеподобных грибов, выделенных от пациентов с МВ.

Материалы и методы. Объектами исследований служили клинические изоляты дрожжеподобных грибов, выделенные из зева и мокроты 22 пациентов с МВ. Возраст пациентов варьировал от 2 до 14 лет. У 10 пациентов материал забирали в стадии обострения заболевания, 5 пациентов находились в стадии ремиссии, 7 пациентов были обследованы через месяц после проведения антибиотикотерапии. Для выделения грибов рода *Candida* материал сеяли на среду Сабуро и на хромогенный агар.

Исследования действия гидролатов на рост дрожжеподобных грибов проводились в соответствии с МУК 4.2.1890-04 (Определение антимикробной активности антибиотиков и химиопрепаратов) методом двукратных разведений в питательной среде. Измерения оптической плотности образцов проводили с помощью спектрофотометра Multiscan через каждый час при =540нм. Объем среды Сабуро во всех вариантах опытов составлял 180 мкл, объем взвеси грибов 20 мкл. Исследовали действие гидролатов в соотношении 1:1 к питательной среде. Плотность суспензии суточных культур микроорганизмов составляла 2,0 ед. мутности по МакФарланд. В контрольных образцах вместо гидролата вносили 0,9% раствор хлорида натрия. Определяли коэффициент роста культур как отношение оптической плотности образца (ОП) в конце экспоненциальной фазы роста к начальной ОП, в процентах. Также определяли величину Тмакс.-времени достижения максимального

коэффициента роста культуры, которое соответствует поздней экспоненциальной фазе роста.

Действие эфирных масел чабреца и монарды на культуры условно-патогенных грибов оценивали при нанесении дозатором 5 мкл масла на стерильный бумажный диск диаметром 6 мм, который помещали на чашку Петри с растущей культурой (0,1 мл суспензии микроорганизма плотностью 2,0 ед. мутности по МакФарланд). Результат оценивали визуально, измеряя диаметр зоны отсутствия роста вокруг диска.

Действие гидролатов монарды, чабреца и чабера горного на рост музейной культуры *Aspergillus fumigatus* исследовали, внося гидролат в питательную среду Сабуро в соотношении 1:5.

Результаты. У 8 из 10 пациентов в стадии обострения болезни из материала были выделены грибы рода *Candida*, причем, у 7 пациентов они выделялись в ассоциации с бактериями, в основном, *Pseudomonas spp.* и (или) *S. aureus*. Из 5 пациентов в стадии ремиссии только у одного были выделены грибы. Через месяц после терапии у 2 из 7 пациентов выделялись грибы рода *Candida* без ассоциаций с условно-патогенными бактериями.

Из 11 изолятов дрожжеподобных грибов 9 относились к виду *C. albicans*, 1-к виду *C. krusei*, 1-к виду *C. auris*. Один изолят был резистентен только к итраконазолу, 10 культур были резистентны к итраконазолу и флюконазолу. Все грибы были чувствительны к нистатину, амфотерицину В и клотримазолу.

Масло монарды оказывало выраженное подавляющее действие на рост грибов рода *Candida*: диаметр зоны подавления роста составлял 50-70 мм в зависимости от выделенной культуры. Масло чабреца обладало меньшим ингибирующим эффектом: зоны подавления роста составляли от 32 до 47 мм, только у одного изолята его действие было сходным с маслом монарды.

Коэффициенты роста культур грибов при действии гидролатов монарды, чабреца и чабера горного по отношению к контрольному образцу без гидролата составляли 2-3%, 31-21% и 21-17%, соответственно, в зависимости от выделенного изолята.

Таким образом, эфирные масла и гидролаты монарды, чабреца и чабера горного оказывали выраженное подавляющее действие на рост грибов рода *Candida*.

Культура *Aspergillus fumigatus* не росла на средах с добавлением гидролата монарды, чабера горного или чабреца.

Выводы. У больных МВ в стадии обострения заболевания наблюдается персистенция ассоциаций микроорганизмов, в 8 из 10 таких биопленок встречаются грибы рода *Candida*. Биопленка является важным фактором выживания грибов в полимикробной среде легких при муковисцидозе. Эфирные масла и гидролаты монарды, чабреца и чабера горного подавляют рост грибов, причем, наиболее выраженное противогрибковое действие проявляет масло и гидролат монарды. Сочетая в аэрозолях гидролаты с антимикробной активностью с гидролатами, снижающими вязкость мокроты, можно значительно улучшить общее состояние пациентов с МВ и уменьшить вероятность инфекционных осложнений органов дыхания.

Список литературы

1. Муковисцидоз. Под ред.Н.И. Капранова, Н.Ю. Каширской// Медпрактика-М, М.;2014

2. Старовойтова Э.В. Роль грибов при муковисцидозе у детей.// Автореф. канд. дисс, Спб, 2000.

3. Rania Belabbes , Mohammed El Amine Dib , Nassim Djabou et al. Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula* arven*sis L.* from Western Algeria// Chem Biodivers, V14(5), 2017.

4. Andreana Marino, Antonia Nostro,Narcisa Mandras et al. Evaluation of antimicrobial activity of the hydrolate of Coridothymus capitatus (L.) Reichenb. fil. (Lamiaceae) alone and in combination with antimicrobial agents//BMC Complementary Medicine and Therapies,V.20,2020.

5. Постникова О.Н., Сатаева Т.П., Куевда Т.А., Бакова Н.Н., Крыжко А.В.//Успехи медицинской микологии, 2022.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РАЗВИТИЯ И ЛЕЧЕНИЯ АЛЬВЕОЛИТА

Шулаков В.В., Просычева О.О., Подпорин М.С., Сейфуллаева Л.Р.
МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва

Несмотря на совершенствование хирургических техник, а также развитие способов и средств медикаментозной коррекции раневого процесса при различной степени бактериальной обсеменённости

хирургических ран, сохраняется риск возникновения осложнений раневого процесса на этапах лечения [1,2]. В современной стоматологической практике актуальной остается проблема лечения пациентов с альвеолитом. Согласно статистическим данным частота встречаемости альвеолита составляет от 5 до 43% от всех осложнений, возникающих после удаления зуба [4]. Это обусловлено как потерей кровяного сгустка из лунки в течение первых трех суток после проведения хирургического вмешательства, так и проникновением микроорганизмов в послеоперационную область из очагов инфицирования, а также неудовлетворительная гигиена полости рта [3]. Альвеолит характеризуется выраженным болевым синдромом, а также отеком и гиперемией слизистой оболочки послеоперационной области. Существует множество методов лечения альвеолита : хирургических, медикаментозных и физиотерапевтических. Особое внимание следует уделить препаратам, используемым для лечения данного осложнения (данной нозологии).

Поиск новых и эффективных схем этиопатогенетической терапии пациентов с данным заболеванием является актуальной задачей для врачей-стоматологов и хирургов. Перспективным и патогенетически обоснованным является применение «Кипферона» – комплексного иммунобиологического препарата, содержащего иммуноглобулины 3-х основных классов – M, G, A и рекомбинантный человеческий интерферон альфа-2b.

Было проведено обследование и лечение 30 пациентов в возрасте от 25-60 лет с диагнозом «альвеолит». Для проведения данного исследования пациенты были распределены на 2 группы в зависимости от планируемого вида оперативного вмешательства. В 1 группе проводилась ревизия лунки с применением йодоформного тампона, во 2 группе -ревизия лунки с использованием антимикробного и иммуномодулирующего препарата Кипферон. Оценивалось содержание интерферона в слюне: у пациентов 2-й группы в 13,3 % случаев выявлено его повышение в 2-4 раза. Тенденция к повышению в динамике среднего уровня интерферона в слюне выявлена у больных, получавших Кипферон. При антисептической обработке лунок удаленных зубов ввиду местного пролонгированного воздействия препарата клинические симптомы (боль, отек и гиперемия) значительно уменьшились во 2-й группе.

Для оценки антимикробной активности препарата Кипферон

проводили программируемое автоматическое культивирование *S. aureus*. Результаты регистрировали неинвазивно, с использованием встроенной системы измерения показателя оптической плотности (OD), в соответствии с ключевыми точками развития культуры в периодической системе культивирования. Статистическую обработку проводили путем построения регрессионной зависимости (парабола второго порядка), с оценкой критерия Фишера.

По результатам культивирования исследуемых образцов отмечалось следующее:

- при достижении бактериальной популяцией значений оптической плотности сопоставимой с периодом ускоренного развития культуры (6 ч.) и при добавлении 1 мл исследуемого образца, отмечалась сохранность скорости бактериального прироста до 10 часа эксперимента. Лог-фаза развития клеток наступила позже на 2 часа, относительно контрольного образца, однако при этом имела более интенсивный характер развития. Ключевой показатель OD в окончании истинного лог-прироста бактериальных клеток – 3,1±0,3 mcf (12 ч.). Период отрицательного ускорения (P-3) не отличался измененной тенденцией по построению кривой развития; имел продолжительность до 2 часов, со снижением скорости генеративных процессов. К 14 часу культивирования был достигнут ключевой показатель – 3,4±0,3 mcf. Стационарная фаза также не имела признаков изменения OD, и средний показатель был ниже на 8% относительно контрольного образца, что статистически достоверно не было.
- при добавлении 3 мл Кипферона, также, отмечалась пролонгация периода P-1. Лог-фаза развития популяции в периоде P-2 отмечалась более низкой скоростью увеличения OD относительно предыдущего образца, однако была сопоставима с контрольной пробиркой. Учитывая пролонгацию периода P-1 и сохраненную продолжительность логарифмического прироста достижение ключевых показателей культивирования было более поздним: показатель – 2,9±0,3 mcf (14 ч.) – снижение относительно контрольного образца на 17%, показатель – 3,1±0,3 mcf (16 ч.) – снижение относительно контрольного образца на 15%.

Таким образом, проведенные эксперименты с использованием методики автоматического программируемого культивирования выявили различия в развитии бактериальных популяций, с учетом добавления исследуемых образцов. Возможно констатировать, что

применение исследуемых образцов в различной концентрации способствует изменению скорости бактериального прироста, тем самым обуславливая картину бактериостатического действия. В сравнении образцов между собой отмечались различия в наступлении отдельных период и фаз развития микробных клеток. Можно говорить о том, что препарат Кипферон благодаря своему составу оказывает антимикробный и иммунокорригирующий эффект, способствуя элиминации патогенов.

Список литературы

1. Remschmidt, B. Surgical site infections in orthognathic surgery: prolonged versus single-dose antibiotic prophylaxis. / B. Remschmidt, M. Schwaiger, J. Gaessler [et al.] // Int. J. Oral Maxillofac. Surg. — 2023. — Vol. 52. — p. 219-226.

2. Davis, C. M. Prevalence of surgical site infections following orthognathic surgery: a retrospective cohort analysis. / C. M. Davis, C. E. Gregoire, T. V. Steeves [et al.] // Int. J. Oral Maxillofac. Surg. — 2016. — Vol. 74. — p. 1199-1206.

3. Микроэкология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов: монографии / И.П. Балмасова, В.Н. Царев, О.О. Янушевич, И.В. Маев, А.М. Мкртумян, С.Д. Арутюнов. – М.: Практическая медицина, 2021. – 264с. ISBN 978-5-98811-665-3.

4. Шулаков, В. В. Современные направления профилактики осложнений хронического одонтогенного верхнечелюстного синусита при перфорациях дна верхнечелюстных пазух. / В. В. Шулаков, В. В. Лузина, А. А. Бирюлев [и др.] // Клиническая стоматология. — 2015. — Т. 74, № 2. — С. 24-32.

ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ АНТИМИКОТИКОВ

Синева О.Н., Маркелова Н.Н., Бычкова О.П., Иванкова Т.Д., Садыкова В.С.

НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Москва

В настоящее время во всем мире остро стоит проблема устойчивости к антибиотикам патогенных микроорганизмов. К решению данной проблемы необходим комплексный подход: в первую очередь - прекращение необоснованного применения антибиотиков в медицине и

сельском хозяйстве, введение ограничений на использования одних и тех же препаратов в данных сферах, а также - поиск новых антимикробных метаболитов, способных преодолевать устойчивость резистентных патогенов. Актиномицеты – грамположительные бактерии, являющиеся продуцентами огромного количества биологически активных соединений, в том числе обладающих антифунгальным действием и, как показывают последние исследования, потенциал данной группы бактерий далеко не исчерпан. В связи с тем, что основное количество изученных актиномицетов являются представителями мезофильной группы бактерий и выделены из почвы, для поиска продуцентов новых антибиотиков стоит рассматривать другие экологические ниши, такие как пресные и морские водоемы, зоны с экстремальными природными условиями [1-5].

В лаборатории таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» создана коллекция галотолерантных актиномицетов, выделенных из илистых отложений озера Тамбукан (Россия, Ставропольский край) – 192 штамма и донных отложений Тронхеймс-фьорда (Норвегия) – 146 штаммов. На основании культурально-морфологических и молекулярно-генетических (анализа гена 16S рРНК) признаков была установлена родовая принадлежность культур актиномицетов, для штаммов, проявляющих высокую антифунгальную и антибиотическую активность – видовая принадлежность. Исследования показали, что большинство штаммов, выделенных из донных отложений Тронхеймс-фьорда относятся к распространенному роду *Streptomyces*, на втором месте по количеству выделенных штаммов - представители рода *Micromonospora*, на третьем – *Nocardiopsis*. Среди актиномицетов, выделенных из озера Тамбукан преобладали виды родов *Streptomyces* (90 штаммов) и *Micromonospora* (78 штаммов). Показано, что все изоляты способны к активному росту на плотных питательных средах Гаузе 1, Гаузе 2, овсяном агаре с содержанием NaCl в количестве 10 г/л, 20г/л, 30г/л.

Проведенные исследования антифунгальной активности при глубинном культивировании актиномицетов в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37, *Fusarium solani* ВКПМ F-890, *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148 показали наличие высокой антифунгальной активности у 21 штамма актиномицетов, выделенных из Тронхеймс-

фьорда: *Streptomyces sampsonii* 6N, 8N, 521N, *Streptomyces halstedii* 22N, *Streptomyces brevispora* 12N, *Streptomyces hirsutus* 23N, *Streptomyces niveus* 14N, *Nocardiopsis alba* 24N, 73N, 85N, 106N, *Nocardiopsis alborubida* 722N, *Nocardiopsis umidischolae* 755N, 763N, *Micromonospora cabrerizensis* 7N, *Micromonospora parathelypteridis* 840N, *Micromonospora matsumotoense* 196N, 711N, 680N, 544N, *Micromonospora aurantiaca* 211N. Среди актиномицетов, выделенных из илистых отложений озера Тамбукан высокая антифунгальная активность обнаружена у штаммов: *Streptomyces xinghaiensis* 56, 72, *Streptomyces bacillaris* 59, 79, *Streptomyces californicus* 178, 187, 188, *Streptomyces rameus* 179, *Streptomyces violaceus* 184, 788, *Streptomyces umbrinus* 198, *Streptomyces liliifuscus* 202, *Streptomyces xanthophaeus* 206, *Streptomyces antimycoticus* 233, 343, *Streptomyces badius* 370, 13T2, 20T2, *Streptomyces parvus* 372, 1T2, 12T2, 17T2, *Streptomyces albidoflavus* 655, 657, *Streptomyces zaomyceticus* 715, *Streptomyces anulatus* 749, 14T2, *Streptomyces venetus* 774, *Streptomyces xiangluensis* 786, *Streptomyces pratensis* 5T2, 14T2, *Streptomyces microflavus* 7T2, *Streptomyces sampsonii* 18T2, *Streptomyces intermedius* 23T2, *Micromonospora palomenae* 772, 4T, *Micromonospora vinacea* 727, 249, *Micromonospora*. *rubida* 38T, *Micromonospora veneta* 36T. Стоит отметить, что у большинства штаммов актиномицетов обнаружена также антибиотическая активность в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-организмов.

В исследовании было выявлено большое видовое разнообразие галотолерантных актиномицетов, обладающих антифунгальной активностью, которые могут быть продуцентами новых антимикотиков.

Список литературы

1. Hutchings, M.I.; Truman, A.W.; Wilkinson, B. Antibiotics: past, present and future. Curr. Opin. Microbiol. 2019, 51, 72–80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008

2. Law J.W.F., Letchumanan V., Tan L.T.H., Ser H.L., Goh B.H., Lee, L.H. Editorial: The rising of “Modern Actinobacteria” era. Prog. Microbes Mol. Biol. 2020, 3 (1): a0000064. doi: 10.3687/pmmb.a0000064

3. Verma M., Lal D., Kaur J.,Saxena, A., Kaur, J., Anand S., Lal R. Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. Res. Microbiol. 2013. 164 (7): 718–728. doi: 10.1016/j.resmic.2013.04.002

4. Wibowo J. T., Bayu A., Aryati W.D., Fernandes C., Yanuar A., Kijjoa A., Putra M.Y. Secondary metabolites from marine-derived bacteria with antibiotic and antibiofilm activities against drug-resistant pathogens. Mar. Drugs 2023;

21 (1), 50. doi: 10.3390/md21010050

5. Trenozhnikova L, Azizan A. Discovery of actinomycetes from extreme environments with potential to produce novel antibiotics. Cent Asian J Glob Health. 2018. 14;7(1):337. doi: 10.5195/cajgh.2018.337.

АНТИМИКОТИКИ РАСТИТЕЛЬНОГО И МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Асфха З.А.[1], Романовский А. С.[2], Травкин В.М.[1], Соляникова И.П.[1]
[1]Белгородский национальный исследовательский университет
[2]Индивидуальный предприниматель, Белгород

Грибковые инфекции наносят существенный вред здоровью человека, животных и растений. В последнее время отмечается рост грибковых заболеваний, одной из причин называют интенсивное использование антибиотиков и, соответственно, повышение резистентности патогенов к антибиотикам.

В этой связи использование растительных антимикотиков и вторичных метаболитов бактерий в качестве компонентов лекарственных препаратов приобретает значительную актуальность. Известны препараты на основе растительного сырья, входящие в составы для лечения грибковых инфекций человека. В частности, используются такие растения, как симплокос кистевидный (*Symplocos racemosa*), сарака индийская (*Saraca indica*), фикус кистевидный (*Ficus glomerata*) и др. Что касается защиты растений, биопрепараты на основе микробных метаболитов обретают все большую популярность благодаря способности бактерий контролировать рост фитопатогенных грибов и эффективно конкурируют с химическими средствами защиты растений.

Целью данной работы был поиск препаратов растительного и бактериального происхождения, ингибирующих рост грибов-патогенов человека и растений.

В качестве тест-культур были использованы штаммы *Candida parapsilosis* Y-58, *Candida albicans* Y-3038, *Candida albicans* Y-2994, *Candida tropicalis* Y-2771, *Wickerhamiella pararugosa* Y-2582 и фитопатогены *Fusarium avenaceum* F-132, *Pythium vexans* F-1193, *Fusarium avenaceum* F-132, *Rhizoctonia solani* F-895, *Alternaria brassicicola* F-1864.

В качестве потенциальных антимикотиков использованы экстракты растительного сырья и культуральная жидкость бактерий, выделенных

из меловых почв Белгородской области. Тест-культуры суспендировали в стерильной водопроводной воде, суспензию использовали для засева «газоном» чашек Петри с агаризованным мальт-агаром. Далее на засеянную патогеном поверхность агара наносили исследуемые антимикотики. Антифунгальную активность оценивали по формированию зон отсутствия роста.

Из 9 проверенных бактериальных изолятов, 6 проявляли антифунгальную активность как минимум против одного фитопатогена. Бактериальные изоляты Z11 и Z15 проявляли ингибирующее действие в отношении всех протестированных фитопатогенных грибов. Величина зоны ингибирования указывает на то, что эти два бактериальных штамма проявляют существенную антимикотическую активность против *Pythium ultimum* F-4782 и *Bipolaris sorokiniana* F-4006. Растительные препараты показали высокую эффективность против патогенов рода *Candida*.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали безусловную перспективность поиска актуальных антимикотиков растительного и бактериального происхождения.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТИОКОНАЗОЛА, ПИРАКЛОСТРОБИНА И ФЛУДИОКСОНИЛА НА РОСТ *FUSARIUM OXYSPORUM* В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Сухова Е.А.[1,2], Зорькина О.В.[3], Нефедьева Е. Э.[1,2], Грибуст И. Р.[2], Колотова О. В.[1,2].

[1]Волгоградский государственный технический университет
[2]ООО «Агро Эксперт Груп», Михалково
[3]Волгоградский государственный университет

Применение фунгицидов - целенаправленное мероприятие по защите растений от болезней [1]. Фунгицидные протравители обладают широким спектром действия против наружных и внутренних инфекций, оказывают положительное влияние на рост и продуктивность культур [2]. В связи с тем, что многие виды грибов проявляют устойчивость к фунгицидным препаратам, актуальным вопросом является разработка новых препаратов с подбором оптимальных сочетаний и концентраций фунгицидов [3].

Целью работы было выявление особенностей фунгицидного

действия протиоконазола, пираклостробина и флудиоксонила в составе протравителя семян, применяемого для защиты растений. Данные фунгициды используются для ограничения заболеваний, вызываемых фитопатогенными микроорганизмами, в том числе грибами рода *Fusarium* [4]. Материалом исследования служили чистые культуры гриба *Fusarium oxysporum*.

Для получения статической культуры фитопатогенного гриба в стерильные колбы с 50 мл стерильной жидкой питательной среды Чапека добавляли 100 мкл суспензии спор гриба, содержащей 103 КОЕ. В эти же колбы вносили растворы лабораторных образцов, чтобы суммарная концентрация действующих веществ в среде составляла 0, 5, 10, 15 ppm. Контролем служила среда Чапека без добавления фунгицида. Эксперимент проводился в 2 параллельных опытах. Мицелий выращивали в течение 7 дней. Затем культуральную жидкость и мицелий фильтровали через предварительно высушенные при температуре 55 оС и взвешенные фильтры (белая или красная лента), полученные фильтры с мицелием высушивали при температуре 55 оС до постоянной массы, повторно взвешивали и рассчитывали массу мицелия.

Полученные результаты представлены на рисунках (рис. 1) и (рис. 2).

Для получения статической культуры фитопатогенного гриба в стерильные колбы с 50 мл стерильной жидкой питательной среды Чапека добавляли 100 мкл суспензии спор гриба, содержащей 103 КОЕ. В эти же колбы вносили растворы лабораторных образцов, чтобы суммарная концентрация действующих веществ в среде составляла 0, 5, 10, 15 ppm. Контролем служила среда Чапека без добавления фунгицида. Эксперимент проводился в 2 параллельных опытах. Мицелий выращивали в течение 7 дней. Затем культуральную жидкость и мицелий фильтровали через предварительно высушенные при температуре 55 оС и взвешенные фильтры (белая или красная лента), полученные фильтры с мицелием высушивали при температуре 55 оС до постоянной массы, повторно взвешивали и рассчитывали массу мицелия.

Полученные результаты представлены на рисунках (рис. 1) и (рис. 2).

При исследовании фунгицидной активности протиоконазола, пираклостробина и флудиоксонила ни в одном варианте не наблюдали полное отсутствие роста мицелия, т.е. фунгицидное действие не было выявлено [5]. Однако можно говорить о фунгистатическом действии на культуры грибов *Fusarium oxysporum*: обе комбинации действующих веществ во всех применённых концентрациях замедляли рост мицелия

грибных культур (рис. 1) и (рис. 2). Культура *Fusarium oxysporum* в эксперименте оказалась более чувствительна к действию композиций пираклостробина с флудиоксонилом, чем композиций протиоконазола с пираклостробином.

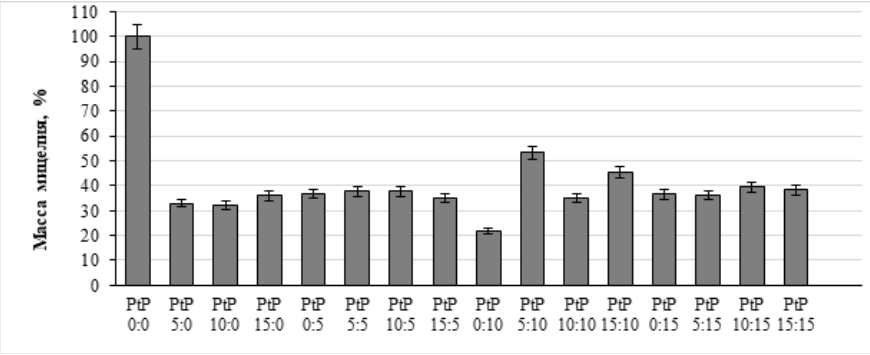


Рис. 1. Влияние протравителей протиоконазол, пираклостробин на рост мицелия *F. oxysporum* в накопительной культуре.

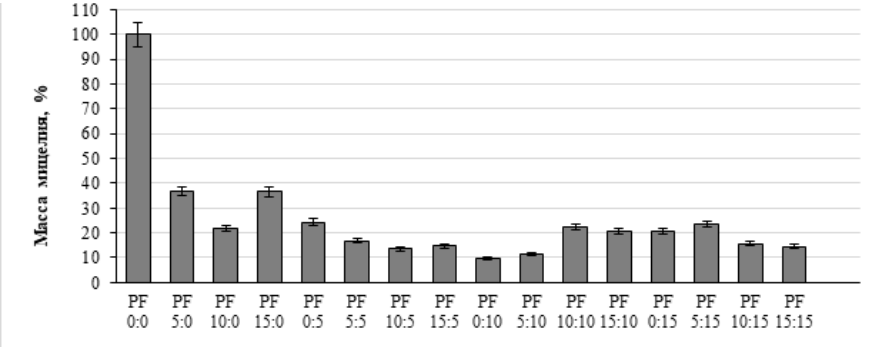


Рис. 2. Влияние протравителей пираклостробин, флудиоксонил на рост мицелия *F. oxysporum* в накопительной культуре.

Протиоконазол как единственное действующее вещество (д.в.) приблизительно в равной степени оказывал фунгистатическое действие на *F. oxysporum* через 7 сут. культивирования. Дозы пираклостробина 5 ppm и 15 ppm следует считать критическими по влиянию на массу мицелия. Более выраженное положительное действие отмечено в дозе пираклостробина P 10 ppm. Под действием протиоконазола в дозе 0 ppm с пираклостробином 10 ppm наблюдалось наибольшее подавление роста

штамма *F. oxysporum*. Концентрацию флудиоксонила, как единственного д.в., 10 ppm можно считать оптимальной, так как при ее увеличении до 15 ppm отмечено увеличение массы мицелия.

Анализ эффективности сочетаний фунгицидов показал, что минимальные дозы пираклостробина в комбинации с протиоконазолом обеспечивают наиболее явное ингибирующее действие по отношению к *F. oxysporum*. В комбинации пираклостробина с флудиоксонилом наибольшее влияние на рост штамма *F. oxysporum* оказывают максимальные дозы пираклостробина. При максимальных дозах флудиоксонила наблюдается стимулирование роста мицелия, что говорит о резистентности грибов [6,7].

Таким образом, оптимальными концентрациями протиоконазола и пираклостробина являлись PtP 10/5, 15/5; пираклостробина и флудиоксонила PF 10/5, 15/5, 5/10.

Список литературы

1. Белицкая М.Н. Грибуст И.Р. и др. Исследование и сравнительный анализ действующих веществ современных протравителей зерновых культур. Вестн. технол. унив. 2015; 18(9): 32-6.

2. Шильникова, Н. В. Влияние пестицидов на биоценоз почвенного покрова / Н. В. Шильникова, Т. В. Андрияшина // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15. – № 7. – С. 140-144.

3. Санеева, Е. А. Исследование фитотоксического действия тебуконазола, протиоконазола, флудиоксонила и препаратов на их основе на энергию прорастания и рост проростков пшеницы и горчицы белой / Е. А. Санеева, О. В. Зорькина, Е. Э. Нефедьева // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. – 2022. – Т. 14, № 5. – С. 166-186. – DOI 10.12731/2658-6649-2022-14-5-166-186.

4. Санеева, Е. А. Влияние фунгицидов на основе тебуконазола, протиоконазола и флудиоксонила на развитие и токсигенность мицелия *Fusarium* / Е. А. Санеева // Актуальные научные исследования в современном мире. – 2021. – № 11-10(79). – С. 129-131.

5. Мягков, Н. Б. Фунгицидные свойства и физиологический эффект действующих веществ из класса стробилуринов / Н. Б. Мягков, Л. В. Мазницына // Аграрная наука, творчество, рост : Сборник научных трудов по материалам XII Международной научно-практической конференции, Ставрополь, 08–11 февраля 2022 года. Том 2. – Ставрополь: Общество с ограниченной ответственностью "СЕКВОЙЯ", 2022. – С. 28-33.

6. Щербакова, Л. А. Развитие резистентности к фунгицидам у фитопатогенных грибов и их хемосенсибилизация как способ повышения защитной эффективности триазолов и стробилуринов / Л. А. Щербакова // Сельскохозяйственная биология. – 2019. – Т. 54, № 5. – С. 875-891. – DOI 10.15389/agrobiology.2019.5.875rus.

7. Оценка фунгицидной активности препаратов для предпосевной обработки семян озимой пшеницы / Н. М. Сидоров, Е. А. Гырнец, М. М. Астахов [и др.] // Таврический вестник аграрной науки. – 2021. – № 4(28). – С. 149-158. – DOI 10.33952/2542-0720-2021-4-28-149-158.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО, АНТИМИКОТИЧЕСКОГО И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Волчек И. А., Теряев А. С., Обернихина Н.И., Мичурина А. П.
Медицинский институт непрерывного образования "РОСБИОТЕХ", Москва
Белгородский государственный аграрный университет им. В. Я. Горина, Белгород
НИЦ Иммунологии и аллергологии, Москва

Патогенез большинства грибковых и бактериальных инфекций связан и/или обусловлен иммунопатологическими реакциями гиперчувствительности, в том числе, инфекционной аллергией. Вследствие этого многие лекарственные формы, особенно топические, содержат противовоспалительные и/или иммуносупрессивные вещества (напр., метилпреднизолон или такролимус). Однако, вследствие известных недостатков имеющихся субстанций, расширение спектра иммуномодуляторов для местного применения, в том числе, с использованием средств традиционной медицины, актуально.

Целью данной работы явилось создание топической фармацевтической композиции, обладающей антимикробным и антимикотическим действием с антиаллергическим и противовоспалительным компонентом.

В качестве иммуномодулирующего и антимикробного средства использован экстракт известного в древней традиционной китайской, индийской, персидской медицине растения – *Angelica archangelica L.* (дудник лекарственный) (Далее АА).

Исследования проводили in vitro. На первом этапе сравнивали микробоцидный эффект

фармацевтической композиции, состоящей из 1% повидон-иода, 10% диметилсульфоксида (ДМСО) и 10% экстракта АА на бактериальные и грибковые микроорганизмы. В качестве контроля тестировали отдельно каждый из компонентов в указанной концентрации.

Исследования выполнялись согласно ГОСТ Р 58151.4-2018. Опыт производили на 5 поверхностях (стекло, кафель, дерево, пластик, линолеум). Экспозиция 5 минут. При изучении бактерицидной активности субстанций в качестве тест-микроорганизмов использовали:

- *Aspergillus niger*, штамм приобретён в ВКПМ (Всероссийская коллекции промышленных микроорганизмов, F-894);

- *Escherichia coli* (штамм 1702), штамм приобретён в ВКПМ (Всероссийская коллекции промышленных микроорганизмов, B 8208);

- *Staphylococcus aureus*, штамм приобретён в ВКПМ(Всероссийская коллекции промышленных микроорганизмов B 6646);

- *Bacillus mycoides*, штамм приобретён в ВКПМ (Всероссийская коллекции промышленных микроорганизмов, B-11120).

Установлено, что при экспозиции исследуемых субстанций в течение 5 минут отмечена 100% гибель тест-микроорганизмов в ответ на указанную фармацевтическую композицию и, отдельно, повидон-иод. ДМСО такой активностью не обладал, штаммы показали устойчивость к данному препарату в изучаемом режиме.

Для оценки иммуномодулирующих свойств композиции провели исследование ее влияния на спонтанную и митоген-индуцированную (фитогемагглютинин –PHA) продукцию цитокинов. Сравнение проводили с чистым экстрактом АА. В эксперименте использовали мононуклеарныеклеткиздоровыхдоноров.Свежуюгепаринизированную кровь (20 МЕ/мл) 10 доноров забирали в вакуумные пробирки. Выделение мононуклеарных клеток (МНК) осуществляли градиентным центрифугированием в градиенте фиколл-пак [1]. Выделенные МНК вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве 1х106 на лунку в объеме 200 мкл среды RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамина, 2мМ/мл HEPES. В контрольные образцы добавляли по 0,15 мл среды RPMI 1640 (Control - культура интактных клеток) или PHA в конечной концентрации 10 мкг/мл (PHA - культура стимулированных митогеном клеток).

Тестируемые препараты (10% экстракт АА чистый–1;фармацевтическая композиция с 10% экстрактом АА -2) разводили средой RPMI 1640 1:5000, исходя из среднего количества крови в мл в

организме человека. Затем, по 0,15 мл вносили в соответствующие лунки. Клетки инкубировали в CO2 инкубаторе при 370С 36 часов. По окончании инкубации надосадочную жидкость переносили в другие планшеты и замораживали при -200 С до использования. В супернатанте определяли концентрацию IFN , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF . Анализ проведен методом цитометрических бус Bio-Plex ProTM Human Cytokine Grp I Panel 8-plex (Bio-RAD) по протоколу производителя. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы «Statistica-7».

Установлено, что PHA достоверно стимулировал выработку изучаемых цитокинов в данной модели эксперимента. Экстракт AA а также экстракт AA в составе композиции, достоверно, по сравнению с PHA, снижали продукцию IL-2, IL-4, IL-6, IFN и TNF , но не IL-8 и IL-10. Например, базальный уровень IL-2 (пг/мл) составил 2,0±7,5, после стимуляции PHA - 40,0±2,3; при добавлении AA - 5,89±0,9*; при добавлении фармацевтической композиции с AA – 4,67±0,7*(* - P≤0,01 по сравнению с PHA). Уровень IL-4 соответственно: 3,4±0,4; 143,08±0,09; 10,6±0,7*; 12,4±1,1*. Уровень IL-6 - 145,3±0,9; 227,9±10,2; 138,7±0,4*; 151,4±0,8*. Уровень IFN - 0,09±0,007; 16,4±1,1; 1,6±0,8*; 2,5±1,2*. Уровень TNF – 0,9±0,1; 115,8±1,3; 10,7±1,4*; 17,9±2,2*.

Изменения относительно уровня синтеза цитокинов интактными (нестимулированными) мононуклеарами оказались недостоверны.

Таким образом, фармацевтическая композиция обладает супрессивными свойствами в отношении продукции TH1 и TH2 цитокинов в условиях антигенной (митогенной) стимуляции, что указывает на ее иммуномодулирующие, преобладающе, иммуносупрессивные свойства.

Спектр веществ, выделенных из растений рода Дудник (Angelica) весьма широк (кумарины, эфирные масла, алкалоиды, фенолы, стерины, бензофураны, полиацетилены и полисахариды). На сегодняшний день обнаружено более 300 химических компонентов (изоимператорин, императорин, оксипейседанин, гидрат оксипейседанина, бергаптен, биакангелицин, феллоптерин, биакангеликол, изопимпинеллин, ксантотоксол, ксантотоксин, пимпинеллин, скополетин, -ситостерол, даукостерол и др.) [2,3,4].

Современные фармакологические исследования родственного растения *Angelica dahurica* показали, что его компоненты проявляли противовоспалительную, противоопухолевую, антиокислительную,

обезболивающую, нейропротекторную, гепатопротекторную активность, противовирусные и антимикробные эффекты, воздействие на кожные заболевания [5]. Особое значение обращают на себя фракции, содержащие фуранокумарины, в частности, ангелицин.Показано, что вещества ингибировали синтез TNF , IL-1 и IL- 4 и высвобождение гистамина, путем уменьшения активации NF- B [3].

Аналогичные данные получены и нами в отношении использованной композиции.

Таким образом, полученная фармацевтическая композиция обладает выраженными бактерицидными и фунгицидными свойствами, а также иммуномодулирующим (иммуносупрессивным) действием в отношении регуляции синтеза цитокинов

и может использоваться для создания топических средств лечения дерматомикозов. Применение препаратов *Angelica archangelica L.* представляется перспективным для профилактики и лечения иммунопатологических реакций гиперчувствительности, в частности, инфекционной аллергии.

Список литературы

1. Практикум по иммунологии : Учеб. пособие / Под ред. И. А. Кондратьевой, В. Д. Самуилова. – М. : Изд-во МГУ, 2001. – 224 с.

2. Hata K, Kozawa M, Yen KY, Kimura Y. [Pharmacognostical studies on umbelliferous plants. XX. Studies on Chinese drug "bvaku-shi". 5. On the coumarins of the roots of *Angelica* formosana Boiss. and *A. a*nomala Lall]. Yakugaku Zasshi. 1963 Jun;83:611-4. Japanese. PMID: 13960930.

3. Li D, Wu L. Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* cause anti-allergic inflammation. Exp Ther Med. 2017 Jul;14(1):874-880. doi: 10.3892/etm.2017.4569. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28673013; PMCID: PMC5488689.

4. Liang B, Xu L, Zou Z and Yang S: Chemical constituents isolated from *Angelica dahurica* var. formosana. Chin Trad Herb Drugs 36: 1132.1137, 2005.

5. Zhao H, Feng YL, Wang M, Wang JJ, Liu T, Yu J. The: A Review of Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. Front Pharmacol. 2022 Jul 1;13:896637. doi: 10.3389/fphar.2022.896637. PMID: 35847034; PMCID: PMC9283917.

Глава 16

НОВЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.16

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕДИЦИНСКИ ЗНАЧИМЫХ ВИДОВ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*

Арашкова А.А., Летвинова В.С.
Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь

Грибы рода *Aspergillus* являются медицински значимыми микромицетами, провоцирующими аллергические реакции, микотоксикозы и оппортунистические микозы у людей с пониженным иммунным статусом [1]. Аспергиллы из секций *Fumigati* и *Nigri* входят в число наиболее опасных для здоровья представителей рода *Aspergillus*, а также характеризуются высоким адаптационным потенциалом по отношению к факторам внешней среды и относятся к космополитным микроорганизмам. Многочисленными исследованиями подтверждена их высокая частота встречаемости среди агентов биоповреждений и пылевых контаминантов в жилых и общественных помещениях [2–4]. Из-за высокого морфологического сходства внутри видовых комплексов идентификация аспергиллов требует не только изучения культурально-морфологических свойств, но и анализа молекулярных мишеней [5, 6]. Применение метода ПЦР со специфичными праймерами является доступным способом ДНК-диагностики видов рода *Aspergillus*, позволяющим не прибегать к дорогостоящей процедуре секвенирования.

Целью данного исследования являлось определение видовой принадлежности представителей рода *Aspergillus* путем проведения ПЦР-анализа. Объектами исследования служили 10 штаммов микромицетов из секции *Fumigati* и 29 штаммов из секции *Nigri*, выделенных из очагов плесневого поражения и пылевых скоплений в жилых помещениях (квартиры, общежития), общественных учреждениях (архивы, музеи), а также из проб, привезенных белорусскими полярниками из Антарктических станций.

Выделение микромицетов из очагов биоповреждений осуществляли путем посева проб на агар Чапека-Докса четырьмя диаметральными штрихами с помощью ватных палочек, а также путем непосредственного рассева мелких фрагментов и осыпающихся частиц пораженных материалов на поверхность питательной среды. Для выделения микромицетов из пыли пробы ресуспендировали в воде и распределяли каплю суспензии «лучами» из центра чашки Петри с помощью стерильной стеклянной палочки [7].

Выделение ДНК из чистых культур микромицетов проводили с использованием лизирующего буфера на основе детергентов катионного и анионного типа (1 % цетилтриметиламмоний бромид и 2 % додецилсульфат

натрия) [8]. Для проведения ПЦР использовали следующий состав реакционной смеси: 2х-премикс (содержащий термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дНТФ и оптимизированный буфер) – 10 мкл, прямой и обратный праймеры (10 пМ/мкл) – по 1 мкл, ДНК-матрица – 1 мкл, вода – до 20 мкл. Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили в геле, содержащем 2 % агарозы и ТАЕ-буфер (1х) с бромистым этидием (50 мкг/л), при напряженности электрического поля 70 В/см и силе тока 380 мА в течение 40–50 мин. ПЦР-анализ проводили с использованием видоспецифичных праймеров, описанных в литературе [9–12]. С целью оптимизации температуры отжига праймеров с соответствующими матрицами и предотвращения образования неспецифических продуктов амплификации экспериментально подбирали параметры ПЦР, используя режим «градиент температур».

В результате проведенных исследований подобраны праймеры, пригодные для идентификации видов *A. fumigatus*, *A. niger* и видов-двойников *A. niger* – *A. carbonarius* и *A. tubingensis*. Для каждой пары праймеров установлена соответствующая температура отжига (50/52/65 °С) (таблица 1), проведена оптимизация программ ПЦР: для праймеров A.fum-For/A.fum-Rev: 95 – 5 мин (1 цикл); 95 – 40 сек, 52 – 30 сек, 72 – 40 сек (30 циклов); 72 – 8 мин (1 цикл); для праймеров AcPKS-F1/AcPKS-R1: 95 – 5 мин (1 цикл); 95 – 40 сек, 52 – 30 сек, 72 – 40 сек (30 циклов); 72 – 8 мин (1 цикл); для праймеров NIG1/NIG2: 95 – 3 мин (1 цикл); 95 – 30 сек, 50 – 30 сек, 72 – 30 сек (35 циклов); 72 – 10 мин (1 цикл), для праймеров ANGF79-For/ANGR139-Rev: 95 – 3 мин (1 цикл); 95 – 30 сек, 65 – 30 сек, 72 – 30 сек (30 циклов); 72 – 8 мин (1 цикл); для праймеров ATUB 1 F/ATUB 2 R: 95 – 5 мин (1 цикл); 95 – 40 сек, 52 – 30 сек, 72 – 60 сек (35 циклов); 72 – 10 мин (1 цикл).

Таблица 1. Видоспецифичные праймеры для идентификации микромицетов рода *Aspergillus*.

Целевой вид	Праймер	Последовательность праймера	GC, %	$T_{отж.}$*	Размер продукта	Ссылка
Секция *Fumigati*						
A. fumigatus	A.fum-For	5′-gcccgccgtttcgac-3′	73	52 °C	136 п.н.	Walsh et al., 2011
	A.fum-Rev	5′-ccgttgttgaaagttttaactgattac-3′	33			
Секция *Nigri*						
A. carbonarius	AcPKS-F1	5′-agcatctatgctggccaatc-3′	50	52 °C	187 п.н.	Spadaro et al., 2011
	AcPKS-R1	5′-aatgtactctcgcgggctaa-3′	50			
A. niger	NIG1	5′-gatttcgacagcatttctcagaa-3′	39	50 °C	245 п.н.	Susca et al., 2007
	NIG2	5′-aaagtcaatcacaatccagccc-3′	45			
	ANGF79-For	5′-cacgttcaagccggactacgc-3′	62	65 °C	598 п.н.	Kanbe et al., 2002
	ANGR139-Rev	5′-caagatgttgtccatcaccgct-3′	50			
A. tubingensis	ATUB 1 F	5′-ggctcataatgctaatgtattttcaaac-3′	32	52 °C	600 п.н.	Susca et al., 2020
	ATUB 2 R	5′-gggcatatcaggaatgggaa-3′	50			

* $T_{отж.}$ – указаны оптимальные температуры отжига праймеров, подобранные в условиях эксперимента

Результаты видоспецифичной ПЦР с ДНК микромицетов, выделенных из пыли и очагов биоповреждений, показали, что все исследованные микромицеты из секции *Fumigati* (10 штаммов) относятся к виду *A. fumigatus*; среди 29 представителей секции *Nigri* к виду *A. niger* относится 25 штаммов, к виду *A. tubingensis* – 4 штамма, вид *A. carbonarius* отсутствует.

Таким образом, проведенный отбор видоспецифичных праймеров для грибов рода *Aspergillus* и оптимизация температурно-временных режимов амплификации диагностических локусов позволили провести идентификацию штаммов из секций *Fumigati* и *Nigri*. Дальнейшее применение ПЦР-анализа в практике микологических обследований будет способствовать повышению эффективности санитарно-гигиенического контроля помещений и может ускорить целевое выявление наиболее опасных видов плесневых грибов.

Список литературы

1. Микробиологическая и масс-спектрометрическая характеристика основных возбудителей аспергиллеза : дис. …канд. мед. наук : 1.5.11 / И.А. Рябинин. – СПб., 2022. – 226 л.

2. Условно-патогенная микобиота пыли в городах разных климатических зон на примере Мурманска и Москвы / М.В. Корнейкова, А.С. Сошина, О.В. Гавричкова // Микол. и фитопатол. – 2021. – Т. 55, № 4. – С. 256–270.

3. Ecology and taxonomy of pathogenic Aspergilli / H.C. Gugnani // Front Biosci. – № 8. – 2003. – P. 346–357.

4. Comparative genotyping and phenotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates from humans, dogs and the environment / I.D. Valdes, J. Berg, A. Haagsman [et al.]. – BMC Microbiology. – 18, 118. – 2018. – https://doi.org/10.1186/s12866-018-1244-2.

5. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus* / R.A. Samson, C.M. Visagie, J. Houbraken [et al.]. // Studies in mycology. – № 78. – 2014. – P. 141–173.

6. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy / D.M. Silva, L.R. Batista, E.F. Rezende, M.H. Fungaro, D. Sartori, E. Alves // Braz. J. Microbiol. – 42 (2). – 2011. – P. 761–773.

7. Микологический анализ пылевидных налетов внутри строений в Антарктиде / И.А. Гончарова, А.М. Тригубович, А.А. Арашкова, Ю.Г. Гигиняк, В.Е. Мямин // Природная среда Антарктики: междисциплинарные подходы к изучению : сб. материалов IV Междунар. науч.-пр. конференции, Домжерицы, 21–23 сентября 2022 г. / редкол.: В.Ф.

Логинов [и др.]. – Минск : БГТУ, 2022. – С. 86–89.

8. Оптимизация условий выделения ДНК из грибов рода *Aspergillus* для последующей молекулярно-генетической идентификации / И.А. Гончарова, А.А. Арашкова, О.В. Евдокимова, Л.Н. Валентович, А.М. Тригубович, А.А. Костеневич // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2016. – Т. 8. – С. 62–72.

9. Molecular detection and species-specific identification of medically important *Aspergillus* species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis / T.J. Walsh, M.C. Wisse, K.J. Grantham et al. // J. of Clinic. Microbiol. – 2011. – Vol. 49, № 12. – P. 4150–4157.

10. Specific PCR primers for the detection of isolates of *Aspergillus* carbonarius producing ochratoxin A on grapevine / D. Spadaro, S. Patharajan, M. Kartikeyan, A. Lore, A. Garibaldi, M. L. Gullino // Ann. Microbiol. – 2011. – Vol. 61, № 2. – P. 267–272.

11. PCR identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on calmodulin gene / A. Susca, G. Stea, G. Mule, G. Perrone // Food Addit Contam. – 2007. – 24 (10). – P. 1154-1160.

12. Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene / T. Kanbe, K. Yamaki, A. Kikuchi // Microbiol. Immunol. – 2002. – Vol. 46, № 12. – P. 841–848.

ОБНАРУЖЕНИЕ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФОРМ САЛЬМОНЕЛЛ В МОРСКОЙ ВОДЕ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Бынина М.П., Матосова Е.В., Белов Ю.А., Яковлев А. А., Щелканов М. Ю.

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток

Формирование некультивируемых (дормантных) клеток у возбудителей сапронозов ряд исследователей убедительно показывают, что при мониторинге водной среды некоторая часть сообщества бактерий может находиться в устойчивом состоянии, что может представлять значительный риск для здоровья человека. Повышение эффективности санитарно-микробиологического контроля объектов морских экосистем, является одной из проблем современной эпидемиологии. Загрязнения прибрежных вод морей может привести к развитию интоксикаций и возникновению инфекционных заболеваний. Основными источниками биологического загрязнения прибрежных вод морей являются сточные воды в которых содержатся пищевые отходы,

сточные воды предприятий пищевой промышленности.

Цель исследования: обнаружить дормантные формы бактерии рода *Salmonella* в морской воде методом ПЦР в режиме «реального времени».

Материалы и методы. В работе использованы бактерии *Salmonella enterica* (штамм 5298 из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова) и морская вода из акваторий Амурского залива. Пробы морской воды с инокулированной культурой бактерий в течение 35 дней подвергались воздействию солнечного света при температуре 18°С. Взвесь жизнеспособных (вегетативных) форм бактерий *S. enteritidis* в морской воде (1000 КОЕ/мл) использовали в качестве положительного контроля, образцы с морской водой без бактерий в качестве отрицательного контроля. После предварительной пробоподготовки по концентрированию образцов из проб морской воды стерильные фильтры с осажденными на них биологическими образцами помещали на плотную дифференциально-диагностическую среду (висмут-сульфит агар, BCA) для подсчета выросших колоний. Отсутствие колоний на дифференциальной среде расценивали как отсутствие жизнеспособных (вегетативных) форм в образцах проб морской воды. Подготовленный осадок из проб морской воды исследовался на наличие ДНК *Salmonella sp.* методом ПЦР в режиме «реального времени».

Результаты. На чашках с осажденными на фильтрах образцами вегетативных клеток были обнаружены колонии черного цвета, круглые с ровным краем, блестящие на поверхности. На чашках с осажденными на фильтрах образцы проб морской воды с инокулированными ранее бактериями *S. enteritidis* и на чашках с осажденными на фильтрах образцами с отрицательным контролем колонии не были обнаружены. Это позволило сделать вывод об отсутствие жизнеспособных клеток сальмонелл в этих пробах. Для подтверждения о возможном наличии дормантных форм в пробах с морской водой с образцами были проведены методом ПЦР в режиме «реального времени». Полуколичественная оценка результатов по выявлению генетических маркеров возбудителей была проведена на основе полученных значений величин пороговых циклов (Ct). Положительными результатами анализа на выявление *Salmonella sp.* считались образцы, в которых пороговое число циклов Ct при постановке ПЦР не превышало 37. При исследовании образцов вегетативных форм клеток значения Ct=14,8, Ct=15,0 подтвердили высокую интенсивность бактериальной нагрузки. Пороговый цикл при исследовании образцов проб морской воды с бактериями *S. enteritidis* составил 34,0 и 34,4 соответственно, что свидетельствует о наличии генетического материала бактериальных клеток сальмонелл. В образцах морской воды (отрицательный контроль) ДНК сальмонелл не была

обнаружена.

Заключение. Результаты проведенных исследований показали, что в модельной системе, близкой к природным условиям, в течение 35 дней культивирования *S. enteritidis* формируется пул устойчивых (дормантных) клеточных фенотипов бактерий. Лабораторная детекция бактериальной контаминации с использованием традиционных методов микробиологического культивирования может привести к недооценке фактического количества жизнеспособных патогенных микроорганизмов в клиническом материале или пробах, взятых с объектов окружающей среды при оценке эпидемиологического риска или проведении санитарно-гигиенических исследований.

Список литературы

1. Andryukov B.G., Lyapun I.N. Molecular Mechanisms of Persistence in Bacteria // EC Microbiology. - 2022. – N 18. - T.6. - C. 33-44.

2. Сомова Л.М., Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Дробот Е.И., Рязанова О.С., Матосова Е.В., Бынина М.П., Тимченко Н.Ф. Патоморфология экспериментальной инфекции, вызванной штаммами *Yersinia pseudotuberculosis*, находившимися в дормантном состоянии // Инфекция и иммунитет. - 2022. – N 12(1). - С. 69-77.

3. 1. Dong K., Pan H., Yang D., et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. - 2020. - Vol. 19, N 1. - P. 149-183.

ВЗАИМОСВЯЗЬ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ОБЩЕГО АНАЛИЗА КРОВИ

Иксанова А.М., Ожован И.М., Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Самойликов П.В.

НИИ Вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Общий анализ крови (ОАК) является универсальным видом исследования. Отклонение от референсных интервалов может свидетельствовать о наличии хронических или острых заболеваний [1]. Компоненты сыворотки крови оказывают противомикробное действие - это белки системы комплемента, иммуноглобулины [2,3], сывороточный альбумин [4], антимикробные пептиды (АМП) [5]. АМП продуцируются различными клетками иммунной системы – нейтрофилами, эпителиоцитами, лимфоцитами и др., при этом большинство АМП, циркулирующих в крови, синтезируют именно нейтрофилы. Целью настоящего исследования явилось выявление

взаимосвязи между антимикробной активностью сыворотки и показателями общеклинического анализа крови.

Исследование проводили на сыворотках здоровых добровольцев и пациентов медицинского центра НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. Общую антимикробную активность нативной сыворотки (ОА-активность) и её фракции с молекулярной массой ниже 100 кДа, содержащей антимикробные пептиды (АМП-активность) оценивали методом спектрофотометрии по отношению к клеткам *Staphylococcus aureus* [6]. Данный метод основан на свойстве антимикробных веществ нарушать целостность мембран клеток микроорганизмов, которые в результате последующего окрашивания поглощают краситель. Снижение концентрации красителя в среде инкубации измеряли спектрофотометрически и выражали в процентах по отношению к контрольному образцу, содержащему физраствор.

Установлено, что ОА-активность являлась относительно постоянной величиной вне зависимости от пола и возраста исследуемых и составляла 77,1% (медиана). Известно, что значительный вклад в ОА-активность вносит сывороточный альбумин [6], при этом установлено, что большая его часть из-за образования димеров не фильтруется через 100 кДа мембрану [7]. В группе обследуемых не было пациентов с низким содержанием альбумина в крови, очевидно, этим и обусловлено отсутствие вариабельности величин ОА-активности. АМП-активность была более вариабельна (медиана 18,6%) и имела различия по возрастным группам: наибольшая АМП-активность соответствовала группе детей до 5 лет (медиана 23,5%) и снижалась с возрастом (рис.1). При этом ОА-активность и АМП-активность находились в обратной взаимосвязи (коэффициент Пирсона r = -0,985), что можно объяснить взаимозаменяемостью высоко- и низкомолекулярных компонентов, обладающих антимикробной активностью.

Установлена прямая корреляция между ОА-активностью и гематокритом (r=0,991). Причиной высокого гематокрита является уменьшение доли жидкости в крови, то есть сыворотка должна быть более насыщена веществами, проявляющими антимикробную активность. Выявлена связь ОА-активности с уровнем гемоглобина (r=0,982), что требует дальнейшего изучения. Связь ОА-активности сыворотки с другими показателями ОАК не выявлена.

Распределение уровней нейтрофилов и лимфоцитов по возрастным группам (рис. 2) показало, что в группе детей до 5 лет (с самой высокой АМП-активностью) абсолютное значение содержания нейтрофилов ниже, чем лимфоцитов, тогда как в остальных группах все наоборот. В норме такие показатели характерны для детей младшего возраста (физиологический перекрест). Поскольку АМП синтезируются по большей части нейтрофилами

[8], то логично предположить наличие взаимосвязи между абсолютным количеством нейтрофилов и АМП-активностью. Однако полученные данные не подтверждают этого предположения (r=-0,431). В то же время установлена прямая корреляция высокой силы между АМП-активностью и абсолютным количеством лимфоцитов (r=0,890). Выявленная прямая корреляция между АМП-активностью сыворотки и количеством лимфоцитов подтверждает участие лимфоцитов в синтезе и/или в регуляции продукции антимикробных соединений [5]. Имеются данные о том, что продуцируемые лимфоцитами цитокины являются важными регуляторами продукции антимикробных пептидов [9]. Достоверно определить причинно-следственную связь сложно: неясно, является ли высокая АМП-активность сыворотки следствием высокого уровня лимфоцитов или имеются иные причины.

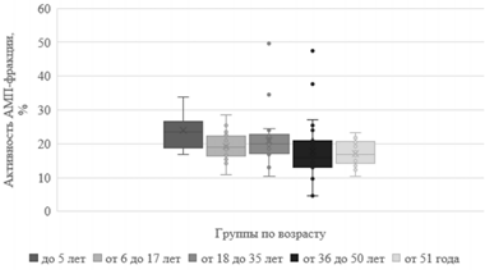


Рис. 1. Распределение АМП-активности по возрастным группам: группа до 5 лет (n=10), группа от 6 до 17 лет (n=28), группа от 18 до 35 лет (n=22), группа от 36 до 50 лет (n=25), группа от 51 года (n=19).

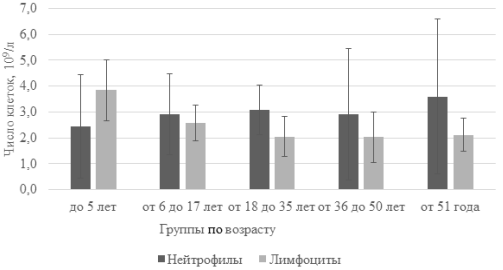


Рис. 2. Уровни нейтрофилов и лимфоцитов в крови в разных возрастных группах: группа до 5 лет (n=9), группа от 6 до 17 лет (n=26), группа от 18 до 35 лет (n=16), группа 36 до 50 лет (n=23), группа от 51 года (n=14).

Список литературы

1. Казакова М. С., Луговская С. А., Долгов В. В. Референсные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего населения.

Клиническая лабораторная диагностика. 2012; 6: 43-9

2. LaRocca T.J., Katona L.I., Thanassi D.G., Benach J.L. Bactericidal action of a complement-independent antibody against relapsing fever Borrelia resides in its variable region. J Immunol. 2008; 180(9): 6222-8.

3. Funakoshi S., Doi T., Nakajima T., Suyama T., Tokuda M. Antimicrobial effect of human serum IgA. Microbiol Immunol. 1982, 26(3): 227-39.

4. Арзуманян В.Г., Ожован И.М., Свитич О.А. Антимикробное действие альбумина на клетки бактерий и дрожжей. БЭБМ. 2019;167(6): 722-5.

5. Иксанова А.М., Арзуманян В.Г., Конаныхина С.Ю., Самойликов П.В. Антимикробные пептиды и белки в биожидкостях человека. Независимые микробиологические исследования. 2022; 9(1): 37-55.

6. Арзуманян В.Г., Михайлова Н.А., АртемьеваТ.А., Бутовченко Л.М., Вартанова Н.О., Ерофеева Т.В., и др. Способ определения противомикробной активности цельной сыворотки и фракции ее антимикробных пептидов. Патент РФ. 2018. № 2686337

7. Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И., Вартанова Н.О., Ожован И.М., Кравцова Е.О., Зверев В.В. Условно-патогенная микробиота грудного молока и антимикробная активность сыворотки на разных сроках лактации. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2023. Т. 100. № б/н. 1-10.

8. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. BLOOD. 2000, 96(8).

9. Kolls J.K., McCray P.B. Jr., Chan Y.R. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. Nat Rev Immunol. 2008, 8 (11), 829-35.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ МИЦЕЛИЯ

***Иванов А. А.*[1,2], *Тяпкин А. В.*[1,2], *Голубева Т. С.*[1,2]**
[1]Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
[2]Новосибирский государственный университет

Выделение РНК из грибов и грибоподобных организмов представляется нетривиальной задачей. Несмотря на внешнюю схожесть, они отличаются разнообразной физиологией и часто требуют индивидуального подхода к, казалось бы, рутинным процедурам. Сложности с выделением РНК возникают в первую очередь из-за толстой клеточной стенки и активных эндогенных РНКаз: обе этих проблемы должны решаться на самых ранних этапах выделения, то есть в процессе измельчения и лизиса клеток [1]. Успех может зависеть

от протокола выделения [2], [3], условий культивирования [4] и даже материала, из которого изготовлены шарики для измельчения [1]. Так, большинство авторов придерживаются измельчения мицелия в жидком азоте [2], [3], [5], [6], однако этот метод плохо масштабируется. Достаточно общеупотребительной для автоматизированной обработки нитевидных грибов и похожих на них организмов является рекомендация по добавлению лизирующего буфера к образцу до измельчения, так как это позволит инактивировать РНКазы [1]. Однако наличие работ, концентрирующихся на выделении РНК из конкретных видов грибов, говорит об актуальности проблемы оптимизации методов работы с определенными организмами [3], [5], [7].

Phytophthora infestans – это паразитический Оомицет, поражающий такие значимые хозяйственные культуры, как картофель и томаты. Не являясь родственником настоящих грибов, она демонстрирует определенное конвергентное сходство с ними, формируя несептированный мицелий с клеточной стенкой из целлюлозы и бета-глюканов [8]. Проблемы, встающие перед исследователем при выделении РНК из настоящих грибов [1], справедливы и в случае *P. infestans*, однако нам не удалось найти специфических публикаций по выделению РНК из нее. В тех работах, где авторы использовали выделенную из оомицетов РНК, в качестве метода зачастую указан TRIzol [9] или RNEasy plant mini kit [10], как общеизвестный протокол без пояснений. Так что целью данной работы была оптимизация стандартных протоколов конкретно для выделения РНК из *P. infestans*.

Для этого мы измельчали мицелий как автоматически на Tissue Lyser LT шариками из нержавеющей стали, так и вручную – в ступке с жидким азотом. Проверили насколько эффективно TRIzol и бета-меркаптоэтанол инактивируют РНКазы и предотвращают деградацию РНК в процессе дробления. Для выделения РНК после измельчения были опробованы TRIzol, RNEasy Plant mini kit и их комбинация. Схема эксперимента представлена в табл. 1. Для оценки качества выделенной РНК применялся показатель RNA integrity number (RIN) [11] и измерялась концентрация посредством прибора Qubit Fluorimeter.

Таблица 1. Схема эксперимента по выделению РНК из *P. infestans*. Буква перед "_" означает способ измельчения: MP – ступка и пестик, NB – Tissue Lyser без буфера, B – с буфером. Следующая буква обозначает протокол: T – TRIzol, Q – RNEasy plant mini kit, TQ – комбинация TRIzol и RNEasy plant mini kit (Table 2). Число после "-" обозначает время измельчения в секундах на приборе Tissue Lyser.

Способ измельчения	Tissue Lyser								Ступка и пестик	
Время измельчения	15 с					30 с	60 с		-	
Измельчение в буфере	Нет		Да			Нет	Нет	Да	Нет	
Протокол экстракции	TRIzol	Qiagen	Qiagen+TRIzol	Qiagen	TRIzol	Qiagen	Qiagen	Qiagen	TRIzol	Qiagen
Шифр протокола	NB_T-15	NB_Q-15	B_TQ-15	B_Q-15	B_T-15	NB_Q-30	NB_Q-60	B_Q-60	MP_T	MP_Q
Количество реплик	2	3	5	3	2	3	3	3	6	3

Результаты измерений RIN и концентраций для всех протоколов представлены в таблице 2. Можно заметить, что измельчение ступкой и пестиком лучше всего предотвращает деградацию РНК.

Таблица 2. Сравнение качества и количества выделенной тотальной РНК.

Шифр протокола	средний RIN ± SEM	средняя C ± SEM (нг/мкл)
NB_Q-15	4.13 ± 0.33	87.87 ± 0.96
NB_Q-30	3.00 ± 0.32	39.93 ± 15.34
NB_Q-60	2.40 ± 0.00	114.20 ± 19.10
NB_T-15	5.40 ± 1.30	117.20 ± 38.80
B_Q-15	5.77 ± 0.43	52.53 ± 6.41
B_Q-60	2.70 ± 0.20	135.00 ± 3.00
B_T-15	5.30 ± 1.10	83.60 ± 9.40
B_TQ-15	5.96 ± 0.43	54.00 ± 11.98
MP_Q	6.03 ± 0.83	114.80 ± 12.32
MP_T	6.45 ± 0.18	145.93 ± 20.71

RIN образцов, обработанных на Tissue Lyser без буфера (кроме NB_T-15) или более 15 с оказался статистически значимо ниже остальных (t.test, $p = 3.6E\text{-}09 < 0.05$). Выпадение NB_T-15 из этого списка может говорить о том, что TRIzol оказывается более эффективным консервантом по сравнению с бета-меркаптоэтанолом, причем при непродолжительном дроблении (15 с).

Исходя из полученных результатов, можно сделать выбор в пользу ступки и пестика. Данный метод обеспечивает охлаждение в жидком азоте на протяжении всего процесса дробления и использовался, в частности, по умолчанию в работах для выделения из грибов РНК очень высокого качества[2], [3]. Тем не менее, низкая продуктивность измельчения ступкой и пестиком ограничивает масштабирование, для чего может быть использован Tissue Lyser: при небольшом времени дробления и обязательном применении ингибитора РНКаз (предпочтительно TRIzol) он показывает себя немногим хуже. 15 с оказывается вполне достаточно для измельчения фитофторы, при этом, в отличие данных [1], бета-меркаптоэтанол оказался не способен защитить РНК в течение более длительного времени. Возможно, разница связана с тем, что Leite с соавторами выделяли РНК из более теплолюбивого организма, в то время как для активации РНКаз *P. infestans* достаточно незначительного повышения температуры.

nПолученные нами результаты неидеальны: так, для секвенирования РНК предпочтительно выбирать образцы с RIN > 7 [15], [16]. Однако РНК с RIN от 6 до 7 также может быть использована для формирования библиотеки. Такая РНК может быть использована и для других молекулярно-генетических приложений, например, для количественной ПЦР, менее требовательной к RIN, при этом часто использующейся как стандарт качества наравне с ним [5], [17].

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук (МК-4311.2022.5).

Список литературы

1. G. M. Leite, N. Magan, and . Medina, “Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: an optimized method for filamentous fungi,” J. Microbiol. Methods, vol. 88, no. 3, pp. 413–418, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.MIMET.2012.01.011.

2. L. Cort s-Maldonado, J. Marcial-Quino, S. G mez-Manzo, F. Fierro, and A. Tomasini, “A method for the extraction of high quality fungal RNA suitable for RNA-seq,” J. Microbiol. Methods, vol. 170, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.MIMET.2020.105855.

3. A. Patyshakuliyeva, *M. R.* M kel , O. M. Sieti , R. P. de Vries, and K. S. Hild n, “An improved and reproducible protocol for the extraction of high quality fungal RNA from plant biomass substrates,” Fungal Genet. Biol., vol. 72, pp. 201–206, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.FGB.2014.06.001.

4. L. A. Papp, L. cs-Szab , S. P liska, and I. Mikl s, “A modified culture medium and hyphae isolation method can increase quality of the RNA

extracted from mycelia of a dimorphic fungal species," Curr. Genet., vol. 67, no. 5, pp. 823–830, Oct. 2021, doi: 10.1007/S00294-021-01181-4/FIGURES/4.
5. A. S nchez-Rodr guez et al., "An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella* fijiensis-Musa *spp.* interaction," Mol. Biotechnol., vol. 40, no. 3, pp. 299–305, Nov. 2008, doi: 10.1007/S12033-008-9092-1/TABLES/1.
6. M. Lange, C. M ller, and E. Peiter, "Membrane-assisted culture of fungal mycelium on agar plates for RNA extraction and pharmacological analyses," Anal. Biochem., vol. 453, no. 1, pp. 58–60, May 2014, doi: 10.1016/J.AB.2014.02.023.
7. *M. R.* de Souza et al., "Comparative assessment of three RNA extraction methods for obtaining high-quality RNA from *Candida* viswanathii biomass," J. Microbiol. Methods, vol. 184, p. 106200, May 2021, doi: 10.1016/J.MIMET.2021.106200.
8. W. E. Fry, "*Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer," Molecular Plant Pathology, vol. 9, no. 3. pp. 385–402, May 2008, doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x.
9. P. Wang et al., "Transcriptome analysis clarified genes involved in resistance to *Phytophthora* capsici in melon," PLoS One, vol. 15, no. 2, p. e0227284, 2020, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0227284.
10. R. Roquigny, A. Novinscak, *T. A*rseneault, D. L. Joly, and *M. F*ilion, "Transcriptome alteration in *Phytophthora infestans* in response to phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas fluorescens* strain LBUM223," BMC Genomics, vol. 19, no. 1, Jun. 2018, doi: 10.1186/S12864-018-4852-1.
11. A. Schroeder et al., "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.," BMC Mol. Biol., vol. 7, p. 3, Jan. 2006, doi: 10.1186/1471-2199-7-3.
12. "Rye B Agar." https://www.protocols.io/view/Rye-B-Agar-36wgqj2ovk57/v1 (accessed Oct. 02, 2022).
13. T. Fisher Scientific, "Procedural guidelines," Accessed: Oct. 02, 2022. Online.. Available: https://www.thermofisher.com/trizolfaqs.
14. J. Fox and S. Weisberg, "An R Companion to Applied Regression +16,000 citations," Thousand Oaks CA Sage., no. September 2012, p. 2016, 2019, Accessed: Oct. 15, 2022. Online.. Available: http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion.
15. "BGI Transcriptome Sequencing - Fast, Accurate - BGI Global, NGS." https://www.bgi.com/global/science-detail/transcriptome-sequencing (accessed Oct. 06, 2022).
16. "RNA-seq Sample Guidelines | Genomics Core Facility | The Huck Institutes." https://www.huck.psu.edu/core-facilities/genomics-core-facility/sample-recommendations/rna-seq-sample-guidelines (accessed Oct. 06, 2022).

17. U. Schumann, N. A. Smith, and M. B. Wang, "A fast and efficient method for preparation of high-quality RNA from fungal mycelia," BMC Res. Notes, vol. 6, no. 1, 2013, doi: 10.1186/1756-0500-6-71.

К ВОПРОСУ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДОВ АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКИ «IN VITRO» У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА С ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Джалилова А.Н., Царуева Т.В., Джалилова Д.Н., Газиев Г.М.
Дагестанский государственный медицинский университет, Махачкала

Не вызывает сомнения, что успешная борьба с хламидийной инфекцией (ХИ) невозможна без использования эффективных методов лабораторной диагностики, что обусловлено отсутствием патогномоничных симптомов при большинстве хламидийных поражений, особенно при инфекционно-воспалительной патологии урогенитального тракта.

Необходимо отметить, что сочетанное применение аллергических и серологических методов диагностики расширит диагностические возможности при изучении урогенитального хламидиоза.

Основанием для изучения диагностической и прогностической ценности при хламидиозе послужили положительные результаты апробации тестов аллергодиагностики in Vitro в условиях экспериментальной хламидийной инфекции.

При проведении данного исследования, нас интересовала возможность использования тестов аллергодиагностики in Vitro у женщин репродуктивного возраста с урогенитальным хламидиозом, а также их прогностическая значимость.

Показатель повреждения нейтрофилов (ППН) и индекс повреждения нейтрофилов (ИПН) определяли у 50 пациенток репродуктивного возраста с хламидийной инфекцией и 32 женщин, свободных от хламидиоза (группа сравнения).

Результаты исследования показали, что (ППН) и (ИПН) у больных с урогенитальным хламидиозом почти в 1,8 раза выше, чем у женщин группы сравнения (0,11 против 0,06).

Через сутки после инъекции хламидийного аллергена число положительных лейколитических проб у пациенток с УГХ увеличилось до 87,9% (с 79,1% до введения хламидийного аллергена). У женщин контрольной группы сравниваемые показатели существенно не отличались ($p>0,05$).

Полученные данные свидетельствуют, что лейколизис со специфическим аллергеном является способом, подтверждающим наличие у наблюдаемых нами пациенток хламидийной инфекции.

Специфичность ППН была проверена использованием гомологичного (хламидийный) и гетерологичного (туберкулин) аллергенов.

Было установлено, что ППН под влиянием гомологичного аллергена (хламидийного) был значительно выше, чем при использовании туберкулина (0,17 ± 0,01 против 0,10±0,02). Полученные данные указывают, что пациентки с УГХ значимо сенсибилизированы антигенами *Chlamydia trachomatis*.

Тесты аллергодиагностики были подтверждены методом микробиологического исследования соскоба из шейки матки. В исследованных образцах люминесцентной микроскопией обнаружены антигены *Chlamydia trachomatis*.

Таким образом, функциональные изменения лейкоцитов крови под влиянием хламидийного аллергена является одним из дополнительных показателей аллергодиагностики урогенитального хламидиоза у женщин репродуктивного возраста in Vitro.

Метод изучения лейколизиса in Vitro с хламидийным аллергеном можно использовать в случаях, затруднительных для диагностики УГХ, как дополнительный тест дифференциации урогенитальные инфекции хламидийной и другой этиологии.

Аллергическая повреждаемость нейтрофилов - это быстрый и чувствительный метод, позволяющий определить сенсибилизацию организма антигенами хламидий.

Статистическая обработка цифровых данных указала на достоверное различие между показателями повреждения нейтрофилов основной и контрольной групп ($t=5,1$; $p<0,05$).

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИНАМИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ БАКТЕРИЙ В МОРСКОЙ ВОДЕ

Матосова Е.В., Бынина М.П., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю.
НИИ институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток

В последние годы, в связи с увеличивающейся антропогенной нагрузкой на различные экосистемы, в том числе на Мировой океан, произошло расширение зон обитания патогенных бактерий, являющихся агентами инфекционных заболеваний человека. Основными источниками биологического загрязнения прибрежных вод морей являются бытовые

сточные воды, в которых содержатся фекалии, пищевые отходы; сточные воды предприятий пищевой промышленности. Не малую роль в этом играет и изменение климата. Патогенные микроорганизмы оказывают стрессорное синергетическое влияние на морские экосистемы, изменяя их функционирование и биоразнообразие. При этом для сохранения жизнеспособности и патогенного потенциала возбудители кишечных инфекций реализуют фенотипическую пластичность и используют различные адаптационные стратегии, а также регуляцию группового поведения (формирование поликультуральных биопленок, в том числе, в ассоциации с морскими сапротрофными бактериями).

Описание динамики роста и развития биологических сообществ в статических условиях лабораторного культивирования сложны по ряду причин. В значительной степени это связано с отдаленным приближением к условиям морских экосистем, где процесс идет в токе жидкости, опосредованном морским течением, наличием изменяющихся температур, запасов пищевых ресурсов, наличием конкуренции со стороны морских бактерий. Перечисленные причины делают невозможным достоверный прогноз динамики формирования биопленки при использовании традиционных статических методов культивирования.

Целью работы была разработка и апробация экспериментальной динамической модели для изучения возможности образования биопленок бактерий на абиотических объектах в морской воде в условиях, приближенных к естественным.

В работе использовались вегетативные и периодические культуры клинических изолятов 512-Ib и 3515-I *Yersinia pseudotuberculosis* из коллекции штаммов НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора. Бактерии выращивали на скошенном агаре (АО «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия) в течение 48 ч. при температуре 4-6оС. Далее готовили взвесь бактерий со стерилизованной морской водой, доводили до концентрации 1000 мк/мл (по стандарту мутности ГИСК имени Л.А. Тарасевича). Конечный объем жидкой фазы составлял 400 мл.

Культуральные, морфологические, тинкториальные и биохимические характеристики опытных, контрольных и тестовых штаммов *Y. pseudotuberculosis* на всех этапах исследования проводились по А.С. Лабинской и соавт. [1] и соответствующим нормативным документам. Оценку ростовых характеристик изолятов *Y. pseudotuberculosis* проводили в соответствие с МУ 3.1.1.2438-09 («Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза») с использованием соответствующих питательных сред (бульон Хоттингера, питательные среды Серова и с индикатором бромтимоловым синим).

Кроме того, с этой же целью применяли основу селективного агара CIN, рекомендованную международным микробиологическим обществом США (American Society for Microbiology, ASM) и Европы (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, ESCMID) в качестве стандарта лабораторной практики для выделения иерсиний [2].

В качестве абиотической подложки использовали предметные стекла (слайды) размером 25x75x1,0 мм и активированной поверхностью Superfrost Plus® (с постоянным положительным зарядом на поверхности) и Polysine Adhesion® (с электростатическим зарядом и биохимическим покрытием, улучшающим адгезию бактериальных клеток) производства Thermo Fisher Scientific. Для реализации экспериментальной динамической модели для изучения возможности биопленкообразования на абиотических объектах в морской воде в условиях, приближенных к естественным, была собрана закрытая система, состоящая из перистальтического насоса и проточной камеры – широкогорлого химического стакана (600 мл) с крышкой и полихлорвиниловыми трубками. Трубки соединялись с перистальтическим насосом (Суперстальтик-02, Россия), создающим регулируемый ток морской воды от 0 до 100 мл/мин. (в работе использовался 50 мл/мин.).

Слайды устанавливались вертикально в стакан с морской водой в специальном штативе для предметных стекол с зазором 3 мм. Конечный объем жидкой фазы составил 400,0 мл. Исследование проводили при температуре 2-4оС в течение 24 ч. Аналогичные исследования были проведены в статических условиях, без использования системы динамического моделирования.

Количественную оценку биомассы биопленки проводили путем измерения оптической плотности окрашенных препаратов. Для окрашивания слайдов использовался метод Sternheimer-Malbin: 2-компонентный краситель (А – кристаллический фиолетовый 3,0 г, этиловый спирт 95%, 20,0 мл, дистиллированная вода 80,0 мл и оксалат аммония 0,8 г; Б – сафранин О, 0,25 г, этиловый спирт 95%, 10,0 мл, дистиллированная вода 90,0 мл) смешивали в отношении 1:1 перед постановкой реакции. Слайды помещали в готовый краситель вертикально, окрашивали 15 мин., после чего промывали дистиллированной водой. Окраска биопленок основывалась на способности компонентов красителя (кристаллического фиолетового и сафранина) связываться с матриксом биопленок [3]. Окрашенные слайды подсушивали на воздухе 5 мин. и измеряли показатели оптической плотности в 60 разных точках поверхности.

Для статистического анализа количественных данных был применен пакет программ Statistica 6.1 Statsoft Inc., USA с использованием методов описательной статистики и непараметрических критериев (multiple measures ANOVA). Количественные данные представлены в виде среднего арифметического значения ± среднее квадратическое отклонение (M±) при

оценке данных естественного разброса. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез был равен 0,05. Для изучения колебаний относительных значений мажорных фракций ЖК вычисляли коэффициент вариации (CV).

Полученные результаты приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Влияние свойств абиотической подложки на формирование биопленок *Y. pseudotuberculosis* с использованием системы динамического моделирования.

Показатели	Типы слайдов (подложек), 24 ч. при 2-4°С		
	Superfrost Plus	Polysine Adhesion	Microscope Slides
Оптическая плотность (M±), у.е.	60,65±4,43	65,33±5,86	43,28±6,51
Коэффициент вариации, (CV) %	7,31	8,97	15,04
Число наблюдений (n)	60	60	60
Значимость различий с контролем (*p*)	< 0,02	< 0,02	

Таблица 2. Влияние свойств абиотической подложки на формирование биопленок *Y. pseudotuberculosis* в статических условиях без использования системы динамического моделирования.

Показатели	Типы слайдов (подложек), 24 ч. при 2-4°С		
	Superfrost Plus	Polysine Adhesion	Microscope Slides
Оптическая плотность (M±), у.е.	49,82±6,33	54,13±7,16	31,64±6,51
Коэффициент вариации, (CV) %	12,71	13,23	20,58
Число наблюдений (n)	60	60	60
Значимость различий с контролем (*p*)	< 0,02	< 0,02	
Значимость различий с динамической системой (*p*)	< 0,001	< 0,02	< 0,02

Выводы

Статистическая значимость различий показателей оптической

плотности в динамической системе была выше, чем на аналогичных слайдах в статических условиях.

Формирование биопленки *Y. pseudotuberculosis* в динамической модельной системе происходит более активно на абиотических подложках с активированными поверхностями по сравнению с подложкой неактивированной поверхностью ($p < 0,02$).

Разработанная экспериментальная динамическая модель позволяет изучать биопленкообразование на абиотических объектах в морской воде в условиях, приближенных к естественным.

Список литературы

1 Лабинская А. С., Блинкова Л. П., Ещина А. С., и соавт. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. Под ред. А. С. Лабинской. - М.: Лань, 2017. - 608 с.

2 Бынина М. П., Андрюков Б. Г., Матосова Е. В., Ляпун И. Н., Дробот Е. И. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических свойств питательных сред для выделения энтеропатогенных иерсиний // Клиническая лабораторная диагностика. - 2018. - Т. 63, N 9. - С. 564-567.

3 Ommen P., Zobek N., Meyer R.L. Quantification of biofilm biomass by staining Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet // J. Microbiol. Methods. - 2017. - N 141. - P. 87-89.

МИКРОФЛОРА ЗЕВА У БОЛЬНЫХ С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Полищук И.С.

РостовНИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону

Проблема этиологической расшифровки внебольничных пневмоний (ВП) и тесно связанный с ней вопрос рациональной антибиотикотерапии до сих пор является актуальной проблемой современной медицины. В 2020-2021 гг на фоне неблагоприятной ситуации по новой коронавирусной инфекции повсеместно отмечается, побьем заболеваемости пневмоний[1]. Для SARS-CoV-2, характерна способность нарушать регуляцию как врожденного, так и приобретенного иммунитета, что приводит к быстрому вторичному бактериальному росту [2]. По литературным данным в нашей стране у больных с ВП наблюдается широкое распространение циркуляции *Streptococcus pneumonia*. В отдельных случаях значение приобретает инфекция, вызванная грамотрицательными возбудителями: *Klebsiella pneumonia, Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* и т.д.

[3].Таким образом, принимая во внимание не только вирусную, но и бактериальную природу пневмоний, актуальным признается изучение спектра возбудителей и их чувствительность к антибактериальным препаратам.

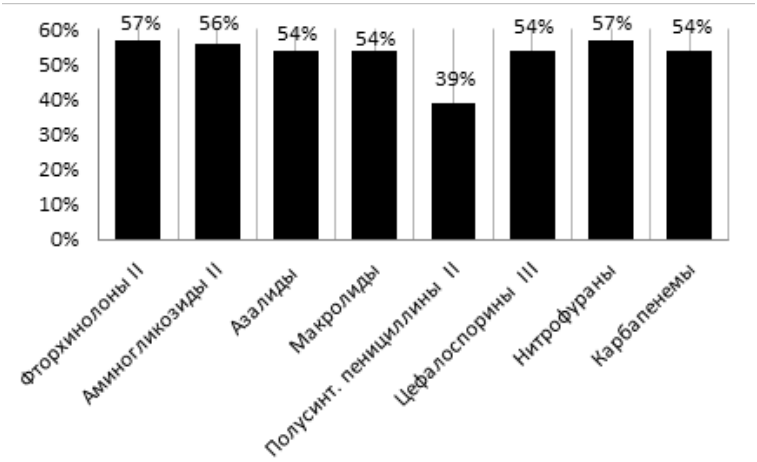
Целью нашего исследования явилось выявление микробиологического спектра возбудителей внебольничных пневмоний в зеве и определение их чувствительность к антибактериальным препаратам.

Материалы и методы: В исследовании вошли n=316 пациентов с ВП, находившиеся в стационарах или на амбулаторном лечении в госпиталях г. Ростова-на-Дону и Ростовской области. Критерии включения в исследование: мужчины и женщины, возраст старше 18 лет, установленный диагноз внебольничной пневмонии (J 18.9) согласно Российским национальным рекомендациям по внебольничной пневмонии (2019), информированное согласие пациента на участие в исследовании. Материал для исследования: мазки из рото/носоглотки. Сбор, транспортирование и исследование биоматериала соответствовали требованиям нормативной документации МР 4.2.0114-16 и МУК 4.2.3115-13. Исследование биологического материала от пациентов проводилось на базе ФБУН Ростов НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора. Верификация вируса SARS-CoV-2 выполнена методом ПЦР в мазках из рото/носоглотки при помощи коммерческих наборов реагентов: «РИБО-преп», «Реверта-L» (ФБУН «ЦНИИЭ», Россия), «ВекторПЦРрв-2019-nCoV-RG» (ГНЦ «Вектор», Россия). Микробиологический спектр возбудителей ВП определяли по средствам бактериологического посева с использованием дифференциально-диагностических сред. Клинически значимыми считали микроорганизмы, выделенные из мокроты в количестве ≥ 105 КОЕ/мл. Идентификацию выделенных патогенов – с помощью масс-спектрометра Microflex Biotyper (Bruker, Germany) MALDI-TOF . Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Excel 2022. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования: У 220 (70%) пациента с диагнозом ВП с помощью ПЦР диагностики выявлен вирус SARS-CoV-2. Доля этиологически значимой микрофлоры в диагностическом титре 106 в 1 г была выявлена в 94% случаев. В 9% (7 случаев) возбудители в ротоглотке не выявлено. У 3 больных (4%) выделена монокультура, у 66 (96%) – смешанная микрофлора. В ходе бактериологического исследования в пробах пациентов с положительными тестами на наличие РНК вируса SARS-CoV-2 выявлено и изучено 178 культур. В микробиоте ротоглоток превалировали представители кокковой флоры: р. *Streptococcus* - 47%, р. *Staphylococcus* -27%. Подавляющее большинство культур микроорганизмов р. *Streptococcus* относились к сапрофитной микрофлоре

слизистой верхних дыхательных путей: *Streptococcus salivarius* (34%), *St.oralis* (25%), *St.mitis* (15%), *St. parasanguinis* (11%). Условно-патогенных стрептококков был изолирован *Streptococcus pneumonia* только у (4%). Бактерии р. *Staphylococcus* были представлены условно-патогенными и сапрофитными *S. haemolyticus* (40%) и *S. epidermidis* (59%) *Staphylococcus aureus* встречался только в 1% случаев. Также стоит отметить высокое выявления грибов р.*Candida*- 31%, доминирующими среди дрожжей в 59% случаев были *C. albicans* и в 30% *C. glabrata*.. Одновременное выявление бактерий и дрожжей *Candida* было зафиксировано в 13% случаев. Редко встречались *Klebsiella spp.* – 3%, Neisseria *spp.* - 4%, *Pseudomonas spp.* –3%. Следует отметить обнаружение нехарактерных возбудителей ВП: *Rothia spp.*- 6%, *Lactobacilus spp.*– 6%.

Проведенное изучение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам показало, что антибиотикорезистентность по отношению к 8 группам препаратов, в том числе защищенным от беталактамаз, находилась в пределах от 39% культур (по отношению к полусинтетическим пенициллинам 2 поколения) до 57% (по отношению к фторхинолонам 2 поколения и к препаратам нитрофуранового ряда). Выявление признака антибиотикорезистентных культур по отношению к тестируемым препаратам представлено на диаграмме 1:



Выводы. Результаты исследования свидетельствуют о том, что доля внебольничных пневмоний, ассоциированных с верифицированными случаями COVID-19 составляет 70 %. На фоне роста заболеваемости COVID-19 в Ростовской области наиболее часто этиологическим агентом ВП бактериальной природы являлись бактерии рода *Streptococcus*, р. *Staphylococcus* и грибы рода *Candida*, как у пациентов с ВП, ассоциированной с COVID-19, так и у пациентов с отрицательным результатом на SARS-CoV-2. Обнаружение нехарактерных возбудителей ВП *Rothia spp.*;

Lactobacilus spp. может быть результатом контаминации мазков из рото/носоглотки микрофлорой полости рта при заборе материала на исследование. Антибиотикорезистентность находилась в пределах от 39% до 57% культур. С практической точки зрения, результаты нашего исследования означают, что лечение общепринятыми стандартами лечения комбинациями цефалоспоринов III-IV поколений и макролидов может быть неэффективным в отношении достаточно большого числа лиц. Решение этой проблемы возможно путем расширения комбинации антибиотиков с включением респираторных аминогликозидов, антибиотиков группы гликопептидов.

Список литературы

1. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Авдеев С.Н., Тюрин И.Е., Руднов В.А., и соавт. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015; 17(2):84–126.

2. Рачина С.А., Бобылев А.А. Атипичные возбудители внебольничной пневмонии: от эпидемиологии к особенностям диагностики и лечения. Практическая пульмонология. 2016; 2:20–7.

3. Рачина С.А., Иванчик Н.В., Козлов Р.С. Особенности микробиологической диагностики при внебольничной пневмонии у взрослых. Практическая пульмонология. 2016; 4:40–7.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РЕАКЦИИ КОАГГЛЮТИНАЦИИ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ *B. PSEUDOMALLEI* В ПОЧВЕННЫХ ПРОБАХ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ЭНДЕМИЧНОЙ ТЕРРИТОРИИ ВЬЕТНАМА

Рябинина Л.А., Терешко Д.Л., Тетерятникова Н.Н., Кулаков М.Я., Пушкарь В.Г., Новицкая И.В.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Мелиоидоз – особо опасная инфекция, этиологическим агентом которой выступает почвенная грамотрицательная палочка *B. pseudomallei*, относящаяся ко II группе патогенности. Возбудитель отличается эндемичным распространением в регионах тропического пояса, проходящего через все континенты, однако наиболее высокую заболеваемость мелиоидозом отмечают в Австралии и в странах Юго-Восточной Азии, в частности, во Вьетнаме, где мелиоидоз занимает одно из ведущих мест по летальности. При этом все более часто в

разных точках планеты регистрируют завозные случаи инфекции, а на фоне значительного обострения геополитической ситуации возрастает вероятность использования возбудителя мелиоидоза в качестве агента биотерроризма [1].

Микробиологическая идентификация *B. pseudomallei* осложнена, прежде всего, многообразием фенотипических проявлений возбудителя. Кроме того, высокотехнологичные методы идентификации являются трудозатратными и дорогостоящими. Поэтому, с нашей точки зрения, целесообразным является снижение трудоемкости исследований, проводимых в условиях работы с возбудителями I-II групп патогенности, на этапе отбора подозрительных колоний. В этой связи проблема поиска методов экспресс-выявления возбудителя мелиоидоза становится особенно актуальной [2,3].

Агглютинационным тестам, в основе которых лежит реакция антиген-антитело, присущи как экспрессность, так и четкая визуализация результатов, что при работе в условиях бокса микробиологической безопасности является неоспоримым преимуществом.

Ключевой особенностью реакции коагглютинации (РКоА) является связывание корпускулярных антигенов исследуемых микроорганизмов иммобилизованными на поверхности клеток *S. aureus* Cowan I специфических антител, при этом иммуноглобулины связаны с белком А клеток стафилококка Fc-фрагментами, а Fab-участки сохраняют способность взаимодействия с антигенами. По некоторым данным, протеин А имеет высокую аффинность к Fc-фрагментам кроличьих и обезьяньих иммуноглобулинов, в то время как сила связывания с антителами козы, крысы, мыши и хомяка существенно меньше.

Нами проведено конструирование диагностикума для обнаружения *B. pseudomallei* в реакции коагглютинации с использованием поликлональных кроличьих мелиоидозных иммуноглобулинов.

Цель работы – изучить возможность применения реакции коагглютинации для экспресс-идентификации *B. pseudomallei* при анализе первичных посевов проб почвы, полученных на эндемичной по мелиоидозу территории Вьетнама.

Материалы и методы. Для конструирования диагностикума использовали 10 % суспензию инактивированных мертиолятом натрия клеток *Staphylococcus aureus* Cowan I. Сенситином служили поликлональные кроличьи иммуноглобулины к формоловым клеткам *B. pseudomallei* авирулентного (но неотличимого по антигенной структуре) пуринзависимого мутантного штамма VPA в дозе 3,5 мг/мл. Окрашивание сенсибилизированных клеток стафилококка проводили с применением 2 % раствора фуксина основного. Лиофилизацию иммуноглобулинового

бактериального диагностикума осуществляли в его рабочей 2 %-ной концентрации с использованием среды высушивания на основе реополиглюкина.

Объектами исследования служили подозрительные колонии, выделенные из проб почвы эндемичных по мелиоидозу территорий. Учет результатов реакции коагглютинации проводили визуально, оценивая характер агглютинации и степень просветления капли. Согласно общепринятой схеме, положительной считали реакцию на 3+/4+.

Анализируя первичные посевы, все подозрительные колонии микроорганизмов идентифицировали методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов, а также – в некоторых случаях – с помощью автоматического микробиологического анализатора Vitek 2.

Результаты и обсуждение. В ходе микробиологического исследования проб почвы, отобранных на эндемичных по мелиоидозу территориях Вьетнама, были изучены 126 подозрительных колоний. С учетом многообразия морфологических проявлений *B. pseudomallei*, выбирали мелкие, беловато-кремовые с металлическим блеском, возвышающиеся над поверхностью агара или плоские, гладкие или морщинистые с ровным краем колонии.

Лиофилизированный диагностикум для РКоА растворяли путем добавления дистиллированной воды за час до использования. Реакцию коагглютинации проводили на обезжиренных предметных стеклах в объеме 90 мкл. Для этого отбирали часть колонии и растирали бактериальной петлей в 50 мкл 0,15 М NaCl, после чего в суспензию клеток вносили 40 мкл 2 % диагностикума для РКоА, плавно покачивая стекла для смешивания жидкости. Учет результатов осуществляли ex tempore с использованием подложки белого цвета, и окончательно – через 4-5 минут.

РКоА оказалась положительной в 15 случаях из 126 (11,9 %), при этом характер агглютинации варьировал от мелкохлопчатой до ярко выраженных агглютинатов с полным просветлением жидкости в капле.

Для подтверждения (или опровержения) полученных в реакции коагглютинации результатов все пробы подвергали исследованию методом ПЦР. Штаммы *B. pseudomallei* были идентифицированы в 8,73 % исследований (n=11), при этом все они агглютинировались изучаемым мелиоидозным диагностикумом. Отсутствие ложноотрицательных результатов в реакции коагглютинации свидетельствует о высокой чувствительности препарата, однако, специфичность при этом была достоверно ниже – 26,7 % положительных в РКоА культур по результатам молекулярно-генетического анализа были отнесены к близкородственным микроорганизмам *B. thailandensis*, принадлежащим наряду с *B. m*allei к буркхольдериям кластерной группы *pseudomallei*. Тем не менее, число идентифицированных в ПЦР штаммов *B. thailandensis* оказалось

значительно выше: из 22 выявленных культур в реакцию коагглютинации вступили лишь 4, что составляет 18,2 % исследований. Эти культуры отнесены к вариантным, так называемым BTCV-штаммам (*Burkholderia thailandensis* capsular variant) и представляют интерес для дальнейших исследований [4].

При изучении 126 колоний методом ПЦР 31 из них (24,6 %) были идентифицированы как *B. cepacia*. Следует отметить, что ни одна из этих культур не была агглютинирована мелиоидозным диагностикумом для РКоА, что является дополнительным подтверждением его высокой специфичности.

С помощью автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 были изучены 22 чистые культуры, выделенные из подозрительных колоний. Результаты автоматической идентификации (Vitek 2), РКоА и ПЦР совпали лишь в 45,5 % наблюдений. По-видимому, это обусловлено принципом действия автоматического микробиологического анализатора, который заключается в изучении взаимодействия исследуемого микроорганизма с биохимическими реагентами, что не всегда дает возможность с высокой точностью дифференцировать близкородственные бактерии.

В то же время, реакция коагглютинации позволяет в течение нескольких минут произвести предварительную идентификацию колоний «ab ovo», избегая длительной и трудоемкой пробоподготовки. Благодаря высокой чувствительности мелиоидозного диагностикума при исследовании подозрительных колоний в РКоА *B. pseudomallei* удалось выявить в 100 % случаев, впоследствии подтвержденных методом ПЦР.

Возможность лиофилизации является важным преимуществом стафилококкового диагностикума перед, например, препаратами на основе латексных частиц, которые не всегда выдерживают этап замораживания. Повышение специфичности препарата возможно при использовании в качестве сенситина мелиоидозных моноклональных антител и является направлением для дальнейших исследований. Однако, препараты на основе поликлональных иммуноглобулинов способны охватывать более широкий спектр патогенных буркхольдерий, что также нередко необходимо в исследовательских целях.

Список литературы

1. Dance D.A. Melioidosis and glanders as possible biological weapons. In: Alibek F.A., editor. Bioterrorism and Infectious Agents. Springer Science+Business Media Inc.; New York, NY, USA: 2005. pp. 99–145.

2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под редакцией академика РАМН Г.Г.Онищенко, академика РАМН В.В.Кутырева. Изд. 2-е, переработанное

и дополненное. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.

3. Специфическая индикация патогенных биологических агентов / Под ред. академика РАН Г.Г.Онищенко, академика РАН В.В.Кутырева. – 2-е изд., переработанное и дополненное. – Саратов: ООО «Буква», 2014. – 284 с.

4. Захарова И.Б., Васильева К.В., Буй Л.А-Т., Викторов А.Д., Шпак И.М., Викторов Д.В. Генетическое и морфологическое разнообразие вьетнамской популяции *Burkholderia thailandensis*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2022;40(1):37-45.

(ВП) и тесно связанный с ней вопрос рациональной антибиотикотерапии до сих пор является актуальной проблемой.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА КЛИНОВИДНОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ (ТЕХНОЛОГИЯ ЛИТОС-СИСТЕМА) ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ЭЛЕМЕНТОВ ГРИБА РОДА *CANDIDA SPP.* И ЕГО АССОЦИАЦИЙ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРОЙ

Шатохина И.С.[1], Шатохина С.Н.[1], Шабалин В.Н.[2]
[1]МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского
[2]НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

Грибы рода *Candida* являются типичными возбудителями оппортунистических инфекций и многократно усиливают свой патогенный потенциал при снижении активности иммунной системы хозяина [1, 2]. В ассоциации с патогенными микроорганизмами они усиливают свою патогенность, что ухудшает течение основного заболевания и повышает возможность летального исхода [3]. В настоящее время выявление *Candida spp.* проводится не только традиционными методами диагностики (культуральный посев, метод ПЦР-РВ), но и с помощью метода клиновидной дегидратации (раздел технологии Литос-система), при которой исследуемая биологическая жидкость пациента переводится в твёрдофазное состояние (фацию) с целью выявления структурных маркеров кандидоза [4].

Ранее, при исследовании фаций мочи методом клиновидной дегидратации у пациентов с хроническими заболеваниями органов мочевой системы (пиелонефрит, цистит, мочекаменная болезнь), нами были выявлены четыре основных вида маркерных структур: 1) маркёр дисбиоза - скопление кристаллов астровидной и вытянутой формы; 2) маркер бактериурии - каскады тонких параллельных линий в фациях нативной мочи; 3) ряд структурных элементов гриба *Candida spp.* (в фации мочи с добавлением к ней белкового Литос-реагента) - в

виде псевдомицелия, спор гриба, плёнчатой формы роста гриба в виде «жатой алюминиевой фольги», фронта размножающихся клеток гриба, формирующих «контурный» тип фации; 4) маркер камнеобразования – кристаллизация солей в белковой зоне фаций нативной мочи (при наличии в ней белка) или с добавленным в мочу белковым Литос-реагентом; такая кристаллизация свидетельствует об аномально прочных связях между минеральными и органическими компонентами (непосредственная причина камнеобразования в почках).

Новизна технического приёма в Литос-системе состояла в перекристаллизации структуры фаций мочи посредством их обработки паром кипящей воды в течение 2-3 секунд. Такое воздействие значительно повышало возможность выявления элементов гриба *Candida spp.*, а также одновременное присутствие бактериальных маркеров, маскируемых солевым налётом. Паровая перекристаллизация была проведена на фациях мочи (нативной и с белковым Литос-реагентом) 144 пациентов с хроническими заболеваниями органов мочевой системы. У всех пациентов до перекристаллизации маркеры кандидурии и бактериурии не выявлялись. После перекристаллизации фаций мочи у 21 (14,5%) были выявлены маркеры бактериурии в фациях нативной мочи. У этих же пациентов в ЛР-фациях был обнаружен фронт размножающихся клеток гриба.

В одном случае, у пациентки 42 лет с двусторонним нефролитиазом в нативной фации мочи отмечали скопления кристаллов солей и псевдомицелий гриба рода *Candida spp.* После перекристаллизации на месте кристаллов солей были выявлены признаки наличия *Klebsiella pneumoniae* в виде «следа» лучистой фации. С целью доказательства наличия в моче *Klebsiella pneumoniae* было проведено целенаправленное поэтапное бактериологическое исследование мочи (из одной пробы): 1) при посеве мочи на селективные диагностические среды (5% кровяной агар, Уриселект агар, Сабуро агар) роста микроорганизмов не выявлено; 2) посев в накопительную питательную среду (тиогликолевая жидкая среда) через 20 часов инкубации при 37 С - дал рост сапрофитной флоры (*Staphylococcus epidermidis*, *Epidermidis faecalis*) в незначимом титре <103; 3) микроскопия мазка высева показала грамотрицательные палочки, по морфотипу сходные с *Klebsiella*; 4) при повторном высеве со среды накопления, с площадкой сброса и максимальным рассевом была получена культура, состоящая из грамотрицательных палочек; 5) с помощью ручных методов (короткий пестрый ряд и высев на хромогенную селективную среду Уриселект агар) обнаружена *Klebsiella pneumoniae* в титре <103; 6) диско-диффузионным методом (согласно критериям оценки EUCACT 2022 г.) была определена чувствительность выявленной бактерии к ряду антибиотиков (S-чувствительно: амоксициллин/клавулановая кислота, цефотаксим, цефтазидим, цефепим, имипенем, меропенем, амикацин, ципрофлоксацин). Полученная антибиотикограмма позволила сделать вывод о принадлежности

выявленной бактерии к штамму «дикого типа» *Klebsiella pneumoniae*.

Таким образом, проведение паровой перекристаллизации твердофазной структуры фаций мочи позволило выявлять латентную форму смешанной инфекции гриба рода *Candida spp.* в сочетании с бактериальной микрофлорой.

Список литературы

1. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М: Триада-Х, 2001; 472.

2. Михайлова Ю. В., М. В. Руднева Г.А.Ч. Идентификация возбудителей микозов с помощью секвенирования ДНК // Проблемы медицинской микологии. 2013. № 2 (15). С. 105–106.

3. Pang W. [и др.]. Prevalence of Opportunistic Infections and Causes of Death among Hospitalized HIV-Infected Patients in Sichuan, China // The Tohoku Journal of Experimental Medicine. 2018. № 3 (244). С. 231–242.

3. Шабалин В.Н., Шатохина И.С., Шатохина С.Н. Морфологические структуры *Candida spp.* в биологических жидкостях больных висцеральным кандидозом// Проблемы медицинской микологии. 2021. Т. 23. №3. С. 48-51.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К АЛЛЕРГЕНАМ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Желтикова Т.М., Мокроносова М.А.
НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, Москва

Быстрый прогресс в открытии и описании все новых молекул аллергенов позволяет разрабатывать новые диагностикумы, содержащих на одном микрочипе много различных аллергенов и их молекул, что позволяет одномоментно выявлять все эти компоненты. Внедрение этих тест-систем в рутинную практику аллергологов значительно повышает эффективность диагностического поиска и объективного назначения препаратов для базисной терапии и аллерген специфической иммунотерапии (АСИТ). Диагностическая значимость таких современных диагностикумов заключается в широком, системном подходе к выявлению и прогнозированию рисков и ургентных, жизнеугрожающих состояний вплоть до анафилаксии. В спектр аллергенных компонентов входят молекулы, провоцирующие острые тяжелые аллергические реакции, такие как белки хранения, белки-переносчики липидов, казеин, парвальбумины и тропомиозины [1-6].

Особый интерес представляют аллергенные молекулы мицелиальных грибов, сенсибилизация к которым является прогностическим признаком

развития тяжелого течения бронхиальной астмы и атопического дерматита [7-9].

Цель исследования. Оценить частоту выявления IgE-аТ к аллергенным молекулам мицелиальных грибов у пациентов с аллергическими заболеваниями, проживающими в Москве и Московской области.

Материалы и методы. Сыворотки крови 760 пациентов с атопией были исследованы в диагностикуме ALEX2 (Allergy Explorer 2, MacroArrayDX (MADx), Австрия) для выявления IgE–аТ к 3 видам мицелиальных грибов (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*) и их 7 аллергенным молекулам: 4 молекулы *Aspergillus fumigatus* (Asp f 1, 3, 4, 6); 2 - *Alternaria alternata* (Alt a 1, 6) и 1 - *Cladosporium herbarum* (Cla h 8). Положительными считали результаты, где концентрация IgE–аТ превышала 0,3 kUA/L.

Результаты. В 11,8 % сывороток крови (90 из 760 пациентов) были выявлены IgE-аТ к одному или нескольким видам микромицетов. Частота выявления IgE-аТ к аллергенам грибов была невысока, статистически не отличалась по видам, сопоставима с данными по другим странам и составляла 8,9% пациентов с IgE-аТ к *Alternaria alternata*, 3,4% - к *Aspergillus fumigatus* и 1,6% - к *Cladosporium herbarum*. Эти же сыворотки были исследованы на присутствие IgE-аТ к 7 аллергенным молекулам. Частота выявления IgE-аТ к отдельным аллергенным молекулам варьировала от 0,1% к Asp f 1 до 8,2% к Alt a 1 (табл.1).

Таблица 1. Частота выявления и концентрация IgE-аТ к различным аллергенам мицелиальных грибов у пациентов с атопией (n=760).

Вид	Номенклатура молекул	Частота выявления пациентов с IgE-аТ		Диапазон концентраций IgE-аТ (max; средняя, kU_A/L)
		Абс. (n)	%	
Alternaria alternata	Alt a 1	62	8,2	60,18; 2,18
	Alt a 6	9	1,2	18,49; 0,05
Aspergillus fumigatus	Asp f 1	1	0,1	0,48; 0,02
	Asp f 3	10	1,3	19,32; 0,04
	Asp f 4	8	1,1	3,72; 0,04
	Asp f 6	8	1,1	22,64; 0,10
Cladosporium herbarum	Cla h 8	9	1,2	3,91; 0,02

Список литературы

1. Canonica G.W., Ansotegui IJ, Pawankar R, et al. A WAO—ARIA—GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. World Allergy Organ J. 2013;6:1–16.

2. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, et al. EAACI Molecular Allergology User's Guide. Pediatr Allergy Immunol 2016; 27 Suppl 23:1-250.

3. Heffler E, Puggioni F, Peveri S, et al. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. World Allergy Organization Journal. 2018; 11:1–7.

4. Kleine-Tebbe J, Matricardi PM, Hamilton RG. Allergy work-up including component-resolved diagnosis: how to make allergen-specific immunotherapy more specific. Immunol Allergy Clin N AM. 2016; 36:191–203.

5. Riccio AM, De Ferrari L, Chiappori A, et al. Molecular diagnosis and precision medicine in allergy management. Clin Chem Lab Med. 2016. PMID: 26985687 Review.

6. Panaitescu C, Haidar L, Buzan MR et al. Precision medicine in the allergy clinic: the application of component resolved diagnosis. Expert Rev Clin Immunol. 2022. PMID: 35078387.

7. S nchez P, V lez-Del-Burgo A, Su n E, et al. Fungal Allergen and Mold Allergy Diagnosis: Role and Relevance of *Alternaria alternata* Alt a 1 Protein Family. J Fungi (Basel) 2022 Mar 9;8(3):277, doi: 10.3390/jof8030277.

8. Romantowski J, G rska A, Moszkowska G, et al. Atopy and Multisensitizations in Specific IgE Microarrays and Their Impact on Severe Asthma. Life (Basel) 2022 Sep 29;12(10):1520. doi: 10.3390/life12101520.

9. Celakovska J, Vankova R, Bukac J, et al. Atopic Dermatitis and Sensitisation to Molecular Components of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Malassezia*-Results of Allergy Explorer ALEX 2. J Fungi (Basel). 2021 Mar 4;7(3):183. doi: 10.3390/jof7030183.

Глава 17

ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ

DOI: 10.14427/amm.2023.xxv.17

ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИАГНОСТИКА *BIPOLARIS ZEICOLA* НА ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУРАХ

Дудченко И.П, Кузнецова А.А., Дудченко Г.Н.

Гриб *Bipolaris zeicola* (Stout) Shoemaker (телеоморфа Cochliobolus carbonum R.R. Nelson) вызывает заболевание, известное как «южная пятнистость листьев кукурузы» и имеет карантинный статус для ряда стран Европы и Азии. Заболевание поражает все надземные части растения кукурузы: листья, стебли, початки, зерновки. На листьях вдоль жилок образуются вытянутые желтоватые пятна с темной окантовкой, пораженные зерновки темнеют, сморщиваются, некоторые покрываются темным, сажистым налетом. Пораженное зерно становится непригодным для дальнейшего хранения и использования. Также возбудитель вызывает корневую гниль не только у взрослых растений, но и при появление начальных всходов [3].

Биологической особенностью *B. zeicola* является проявление агрессивности по отношению к одним видам растений и пластичности по отношению к другим. В настоящее время на кукурузе описаны 5 рас возбудителя, отличающиеся по патогенности, симптомам проявления и особенностям развития [1, 2]. В тканях растения-хозяина возбудитель образует 4 разных токсина, различные их сочетания определяют специализацию рас, но в основном патогенность гриба определяет способность Hc-токсина подавлять синтез хлорофилла в листьях хозяина [10]. Сумчатая стадия гриба в естественных условиях встречается крайне редко [6].

По данным информационных источников патоген широко распространен по всему миру и среди экономически значимых культур помимо кукурузы, основного своего растения-хозяина, также может поражать и сорго [6]. Однако круг хозяев этого патогена со временем может быть расширен. Так в 2018 году, из Египта пришло сообщение, что *B. zeicola* вызывает гниение и гибель рассады риса, причиняя значительные убытки производителям [7]. В Аргентине в 2020 году возбудитель *B. zeicola* обнаружен на посевах ячменя [5]. И если перечисленные выше растения относятся к семейству Poaceae, то также имеются данные о поражении этим патогеном яблони, относящейся к семейству Rosaceae [6]. Считается, что пшеница не относится к растениям восприимчивым к C. carbonum и не поражается возбудителем. Однако нами на сегодняшний день было зафиксировано уже несколько случаев выявления *B. zeicola* из всходов и зерна пшеницы, поступившей из южных регионов России. И это первый случай регистрации *B. zeicola* на пшенице в России.

Одновременно с *B. zeicola* на фрагментах листьев и зерне пшеницы был обнаружен вид *Bipolaris sorokiniana* (*Sacc.*) Shoemaker, считающийся наиболее экономически значимым листовым патогеном пшеницы для регионов с теплым климатом, таких, как Бангладеш, Бразилия, Индия Непал и др. [6]. Надо отметить, что *B. zeicola* относится к категории «слабых» патогенов, которые будучи гемибиотрофами, какое-то время могут находиться на хозяине, не вызывая болезни. Началом проявления паразитических свойств может послужить ослабление иммунитета растения, вызванного действием внешней среды или поражением другим возбудителем. Подобным образом *B. zeicola* ведет себя и на кукурузе, гриб часто встречается с такими возбудителями, как *Bipolaris maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker или *Setosphaeria turcica* (Luttr.) K.J. Leonard & Suggs [9]. Образуя патологический комплекс, грибы маскируют симптоматику друг друга, часто оставаясь незамеченными при первичном осмотре. Также и морфологические структуры возбудителей могут иметь сходные характеристики, что затрудняет работу при диагностике заболевания. Так конидии *B. sorokiniana* по внешним признакам могу иметь некоторое сходство с конидиями *B. zeicola*.

Первоначально в нашем исследовании патоген был идентифицирован культурально-морфологическим методом, в дальнейшем диагноз был подтвержден методом ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров Bz-F (5 '-GAGAATACCGACCATGTGG - 3 ') и Bz-R (5 '-TATCTTTAGCTTCCTGTTTGGTC - 3 ') (Kang et al., 2017), с размером продукта амплификации 268 п.о. [4] и универсальных праймеров ITS5 (5´-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3´) и ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) (White et al., 1990), с размером 550 п.о., с последующим секвенированием полученных нуклеотидных последовательностей по участку ITS рДНК [10]. В результате молекулярно-генетических анализов с видоспецифичными и универсальными праймерами вид возбудителя на пшенице был определен, как *B. zeicola*.

Для подтверждения постулата Коха проростки и листья пшеницы были инокулированы суспензией спор, приготовленной из чистой культуры возбудителя. На инфицированных участках растений пшеницы через 7-10 дней образовались характерные симптомы с развитым спороношением. В результате проведенных исследований выделенный гриб был идентифицирован, как *B. zeicola*.

В процессе работы было проведено сравнение культурально-морфологических характеристик изолятов *B. zeicola*, выделенных из растений кукурузы и пшеницы. Несмотря на общую схожесть изоляты имели некоторые различия в структуре и цвете колоний, динамике роста, форме и окраске конидий. Кукурузные изоляты *B. zeicola* образовывали

округлые бархатистые колонии, со слегка волнистым краем, выраженной концентричностью по всей ее поверхности, с меняющимися оттенками концентрических зон от серовато-оливковых до черных. Колонии пшеничного изолята имели округлую форму с ровным краем, менее выраженную концентричность, с преобладанием зон оливкового и серовато-коричневого цветов. Структура колоний пшеничного изолята однородная, с более воздушным, приподнимающимся мицелием.

Грибы рода *Bipolaris* широко распространены на растениях-хозяевах из семейства Poaceae, вызывая у них пятнистости листьев и корневую гниль. Помимо культурных растений они поражают полевые травы и сорняки, которые могут служить резервуарами инфекции [8]. Полученные данные об обнаружении *B. zeicola* на растениях и зерне пшеницы могут послужить для более детальной разработки системы севооборота и защитных мероприятий, а также более полного представления о биологических особенностях этого возбудителя.

Список источников

1. Cassini R., Smith I.M. Cochliobolus carbonum. In: European handbook of plant diseases (Ed. by Smith I.M., et al.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK., 1988, 382.

2. Compendium of Corn Diseases, 4rd ed. by G.P. Munkvold, D.G. White. St Paul, USA: American Phytopathological Society Press (http://www.scisoc.org), 2016, 33-36.

3. Hooker A.L. Field reaction of corn inbreds to Helminthosporium leaf sport. Plant Dis. Reptr. 58, 1974, 909-911.

4. Jeong Kang, Hyeong Kwon Shim, Jae Hwan Roh, Sunggi Heu, and Dong Bum Shin. Simple detection of Cochliobolus fungal pathogens in maize. Plant Pathol J., 2018, 34(4), 327 -32

5. Josefina Cipollone, Cecilia Mourelos, Marina Sisterna, First report of *Bipolaris zeicola* on barley worldwide, Crop Protection, Volume 135, 2020, 105188

6. Manamgoda, D., Cai, L., Bahkali, A., Chukeatirote, E., and Hyde, K. Cochliobolus: an overview and current status of species. Fungal Diversity 51, 2011, 3-42.

7. Rabie A.S. El-Shafey, Kotb A. Attia, Fatma A. Mostafa, Rabab M. Elamawi, Incidence and Molecular Identification of Cochliobolus carbonum as Causal Organism of Rice Seedling Blight, Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, Volume 7, Issue 4, 2018, Pages 652-662

8. Sivanesan, A., Graminicolous species of *Bipolaris*, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs. Mycologia, 1987. 158: p. 1-261.

9. Ullstrup AJ., The impacts of the southern corn leaf blight epidermics of 1970–1971. Annu Rev Phytopathol 10:37. doi:10.1146/annurev.

py.10.090172.000345, 1972

10. White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. Pcr protocols, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990, pp. 315–322.

ФУЗАРИОЗ У РАСТЕНИЯ ЛЮЦЕРНА И ВИДОВОЙ СОСТАВ ЕГО ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

Гасанова В.Я.

Институт микробиологии Министерства Науки и Образования Азербайджана, Баку, Азербайджан

Среди наиболее опасных возбудителей болезней сельскохозяйственных растений особое место занимают грибы, относящиеся к роду *Fusarium* Link. Болезни, вызываемые грибами, относящимися к роду *Fusarium*, наносят значительный ущерб качеству продукции, получаемой из районов возделывания кормовых растений. Плотность населения этого рода грибов в почве колеблется от 2*103 до 10*103 шт/г. По этой причине выращивание сортов растений, восприимчивых к заболеванию, может привести к значительному увеличению популяции этих возбудителей. При хранении зараженные семена интенсивно поражаются плесневыми грибами, что может привести к ухудшению как их кормовых, так и посадочных качеств[1; 2; 5].

Эти грибы широко распространены как в вегетативных, так и в генеративных органах кормовых растений и вызывают различные формы фузариозов, в основном корневые гнили и увядание листьев. Таким образом, значительно снижается продуктивность зараженных болезнью кормовых растений. Таким образом, кормовые растения испытывают значительную потерю веса продуцируемой ими зеленой массы. При этом качество их семян снижается, иными словами, они теряют способность к прорастанию. В то же время известно, что виды грибов, относящиеся к этому роду, обладают способностью продуцировать микотоксины, обладающие канцерогенными, мутагенными, нефротоксическими свойствами, опасные для человека и животных. В связи с этим возникает необходимость изучения видового состава фузариозных грибов на растениях-хозяевах с целью подготовки мероприятий по ограничению численности и вредоносности этого возбудителя[6; 7].

В связи с этим целью представленной работы было изучение фузариозной болезни люцерны и видовой состав его возбудителей.

В качестве области исследования были выбраны посевные опытные поля Научно Исследовательского Института Земледелия Министерства Сельского Хозяйства Азербайджанской Республики, расположенные на территории города Баку. В качестве объекта исследования были взяты сорта Абшерон и Лидер у люцерна посевная (*Medicago sativa* L.), пораженные фузариозом. Образцы, взятые из ростков и листьев растений, пораженных фузариозом, были получены маршрутным и стационарным методами наблюдения в разные фазы вегетационного периода. Пробы почв отбирали из ризосферной части растения. Отделение образцов грибов от почвы проводили методом промывки. А для выведения грибов в чистую культуру использовались твердые питательные среды, такие как Сабуро, сусло-агар, картофельно-агар. Идентификация и выведение возбудителей фузариоза в чистую культуру и определение их культурно-морфологических особенностей изучались известными микологическими методами [3; 4; 8].

В ходе проведенных исследований были изучены фузариоз и видовой состав его возбудителей на сортах люцерна посевного абшеронской и лидерской (*Medicago sativa* L.), характерных для природы изучаемой территории. Как известно, возбудителями фузариозной болезни являются грибы, относящиеся к роду *Fusarium*. Как известно, грибы, относящиеся к роду *Fusarium*, обитают в почвенной среде и поэтому вызывают у растений такие заболевания, как корневая гниль и увядание листьев. Выяснено, что при низкой температуре почвы и высокой влажности в корнях первых всходов, образовавшихся после посева семян люцерна посевного на полях, появляются патогенные грибы рода *Fusarium*. В то же время в полевых условиях увядание наблюдается сразу после развития растения и образования листьев, и этот процесс ускоряется и приводит к его гибели.

В ходе проведенных исследований установлено, что патогенная микобиота растения люцерна посевного представлена 8 видами рода *Fusarium*. Так, род *Fusarium* Lin.k, участвующий в возникновении фузариоза люцерна посевного, характеризуется следующим видовым составом: *Fusarium avenaceum*, *F. gibbosum*, F. *heterosporum*, *F. javanicum*, *F. oxysporium*, *F. sambucinum*, *F. solani*, *F. sporotrichiella*. Из них к возбудителям, вызывающим корневые гнили, образующиеся в корне, то есть в ризосфере растения, относятся *Fusarium avenaceum*, *F. solani*, *F. gibbosum* и *F. oxysporium*, а к возбудителям фузариоза по мере увядания в листьях встречаются виды *Fusarium avenaceum*, *F. gibbosum*, F. *heterosporum*, *F. javanicum*, *F. oxysporium*, *F. sambucinum*, *F.*

sporotrichiella, *F. solani*. Итак, среди перечисленных патогенных грибов доминирует *Fusarium oxysporium*, частота встречаемости которого колеблется в пределах 41-57%. Однако частота встречаемости других грибов этого рода колеблется в пределах 10-20%. Следует отметить, что на второй и третий годы вегетационного периода люцерна посевного возбудители фузариоза в целом сохраняют свое видовое разнообразие, но их патогенность значительно ослабевает. Однако патогенная активность гриба *F. oxysporium* находится на высоком уровне во все фазы вегетационного периода данного растения. На наш взгляд, основная причина всего этого связана с почвенно-климатическими особенностями полей, возделываемых люцерной.

Таким образом, в период выращивания растения люцерны полив почвы, поддержание уровня влажности на нормальном уровне, изменение кислотности, регулировка аэрации, проведение время от времени химических мер борьбы приводят к изменению состава сформированной патомикобиоты вокруг ризосферы, иными словами, к ограничению патогенной активности.

Список литературы

1. Ашмарина Л.Ф. Фузариозы кормовых бобов в лесостепи Западной Сибирии// Сибирский вестник сельскохозяйственных науки. 2008б №7, с. 42-46

2. Билай В.И. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. – Киев: Наукова думка, 1988. – С. 147–182.

3. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии: справочник. – Киев: Наукова думка, 1982. – 550 с.

4. Методические указания по диагностике фитофторозов, корневых гнилей и увядания бобовых культур. – Л.: ВИЗР, 1990, 28 с.

5. Разгуляева Н.В., Костенко Н.Ю., Благовещенская Е.Ю. Фитосанитарная диагностика посевов кормовых культур// Современная микология в России. 2022, том 9, с. 302-304

6. Фадеев Ю.Н. Принципиальные вопросы иммунитета растений к вредным организмам// Сельскохозяйственная биология. 1976, том 2, № 1, с. 131-134

7. Chu Q., Caok M.E., Wu W., Smalley E.B. Immune and bone properties of chicks consuming corn contaminated with a *Fusarium* that induces dyschondroplasia// Avion Dis., 1988, vol. 32, №1, p.:132-136

8. Gerlach W., Nirenberg H. The genus *Fusarium* – a pictorial Atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-u. Forstwirsch. BerlinDachlem 209. – 1982. – 406 p.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ И ИХ БОЛЕЗНИ

Холмуродов У.Э., Камилов Ш.Г., Халмурадов Э.А.
Национальный университет Республики Узбекистан,
Ташкентский государственный аграрный университет,
Узбекистан

С глубокой древности люди для лечения своих недугов пользовались дарами природы. При этом значительное место в укреплении и поддержании жизненных сил отводилась растениям произрастающим в местах их обитания. Растения аккумулирует солнечную энергию, извлекают углекислоту из атмосферы, выделяют кислород и служат решающим условием существования человека и животных.

С древнейших времен человек употребляет растения в пищу и как лекарственные средства. Многовековой опыт народной медицины доказал бесспорность того, что многие растения содержат вещества обладающие целебными свойствами.

В современном здравоохранении около половины всех лечебных средств производят из дикорастущего и культивируемого лекарственного растительного сырья. В настоящее время насчитывается до 12 тыс. растений применяемых в народной и профессиональной медицине. Известно, что из 100 000 современных лекарственных веществ и препаратов около 30 000 приходится на вещества растительного происхождения (Курмуков, Белолипов, 2012). По А.Эргашеву с соавторами (2010) около 50% лекарственных средств производится из сырья лекарственных растений.

Узбекистан располагает огромными запасами лекарственных растений, но это не значит, что они неисчерпаемы. В связи с чем, получение высококачественного лекарственного сырья - важнейшая задача лекарственного растениеводства. Доля последнего составляет не менее 60-70% от произведенного и заготовленного на внутреннем рынке. Обусловлено это тем, что культивирование лекарственных растений, по сравнению с ресурсными заготовками, гарантирует получение качественного сырья.

Препараты из лекарственных растений оказывают на организм более мягкое действие, не вызывая как правило отрицательных побочных осложнений. Популярность фитотерапии в Узбекистане подтверждается массовым обращением населения в аптеки за лекарственными растениями, потребность в которых не всегда удовлетворяется. Об этом свидетельствует огромный интерес к литературе о лекарственных растениях и фитотерапии, проявляемый широкими кругами населения. Усилился интерес к природным средствам и у врачей, причем не только в Узбекистане, но и зарубежом.

Исторический обзор развития знаний о лекарственных растениях Узбекистана приводят А.Г.Курмуков, И.В.Белолипов (2012). История использования лекарственных растений на территории Узбекистана берет начало издавна и связана со времени образования Великого шелкового пути и со священной книги зороастрийцев «Авеста». Большой вклад внесли ученые средних веков – Абу Рейхан Беруний и Абу Али ибн Сина (Авиценна) и многие другие.

Особенно богат исследованиями лекарственных растений в Средней Азии, в частности Узбекистана XX век. Так, в 1943г. при Институте химии Узбекского филиала АН СССР была организована лаборатория химии алкалоидов, что позволило в дальнейшем организовать Институт химии растительных веществ при АН РУз. Большую работу по изучению богатой лекарственной флоры и фитохимии лекарственных растений Средней Азии и Узбекистана проводит Институт химии растительных веществ АН РУз, Институт биоорганической химии АН РУз, кафедра Химии природных соединений Национального Университета, кафедры фармакогнозии, фармакалогии, ботаники Ташкентского фармацевтического института, Научно-производственный центр «Ботаника» Ан РУз и многие другие организации.

Лекарственные растения играют сегодня значительную роль в здравоохранение их удельный вес в Арсенале лекарственных средств достаточно велик. Их сбором выращиванием и переработкой заняты многочисленные государственные и частные организации. Вместе с тем, постоянно ведутся научные исследование в области изучения старых и открытия новых лекарственных растений, эти исследования привели к ряду весьма важных для человечества открытий.

Таковы реальная роль, которую играют лекарственные растения в нашем здравоохранении сегодня.

Особенности культивирования лекарственных растений могут быть выявлены в процессе реализации их биологического потенциала при изменении условий произрастания и способов возделывания. Эти факторы воздействия на растения тесно взаимосвязаны. Условия произрастания помогают раскрыть адаптивные возможности растений; способы возделывания - привести их в соответствие с биологическими потребностями культуры. Результатом оптимально подобранных условий произрастания и способов культивирования - являются эффективные агротехнологии.

Важнейшей задачей лекарственного растениеводства является получение высококачественного лекарственного сырья, успешное решение которой в значительной степени зависит от максимального сокращения потерь урожая от вредных организмов.

Лекарственные растения подвергаются многочисленным заболеванием. По литературным данным установлено, что лекарственные растения поражаются такими болезнями, как мучнистая роса, ржавчина, различные пятнистости и корневые гнили, которые наносят большой урон не только урожаю, но и ухудшают качество получаемой продукции. Изучаемые культуры являются лекарственными и в борьбе с болезнями и вредителями этих культур следует применять экологически чистые средства.

Вредоносность многих заболеваний на лекарственных растениях весьма значительна и складывается из потерь урожая сырья, семян, снижения содержания биологически активных веществ, а нередко и полной гибели посевов. Кроме того, существует скрытая вредоносность заболеваний, проявляющая в основном на многолетниках и выражающая в ослаблении или невызревании надземной части растений.

По вопросу поражаемости болезнями и вредителями лекарственных растений данные отечественной литературы ограничены и они нуждаются в тщательном анализе.

При изучении паразитических грибов на лекарственных растениях микологическое обследования Дроздовской Л.С., Николаева В.Е., Беришвили Л. (1984) показало, что наиболее вредоносные и распространенные грибные болезни лекарственных растений в условиях России - ржавчинные заболевания, корневые гнили и другие болезни.

На Украине на лекарственных растениях чаще всего проявляются септориоз, корневые гнили, вирусные микоплазматические болезни сообщают Спиридонова В.П., Богарда А.П., Мартыновская Н.М. (1986).

По данным Мартыновской Н.М., Николаева В.Е. (1986) изучавшими основные болезни девясила в лесостепной зоне Украины (Полтавская, Херсонская, Хмельницкая области), где культивировали лекарственные растения. При его возделывании основными грибными болезнями оказались мучнистая роса, ржавчина.

Дроздовская Л.С. (1986) изучала вредоносность болезней на лекарственных культурах. По её данным лекарственные растения поражаются микромицетами, на ряде культур паразитируют вирусы и микоплазмы. Вредоносность многих заболеваний весьма значительна и складывается из потерь урожая семян, сырья, снижения содержания биологически активных веществ, а нередко и полной гибели посевов.

Л.С. Дроздовская, В.Е. Николаева (1984) изучали болезни подорожника, который поражается мучнистой росой (*Erysiphe cichoracearum f. plantaginis*), переноспорозом и другими болезнями.

Г.С. Морочковская, В.В. Перенай (1983) изучали патогенную микофлору лекарственных растений, культивируемых на полях Украинской зональной опытной станции ВИИР. В результате исследований выявлено

18 видов и 11 форм грибов, которые поражали 18 видов растений из различных семейств. Преобладают мучнисто-росяные - 5 видов 11 форм и ржавчинные грибы - 5 видов.

Л.С. Дроздовская, В.К. Лыман (1981) изучали мучнисторосяные заболевания на лекарственных культурах, их вредоносность. Описали видовой состав и их особенности развития мучнистой росы на лекарственных растениях, а также меры борьбы с ними.

Э.Ф.Хринунова (1981) определяла видовой состав вредоносных возбудителей грибных заболеваний шалфея мускатного. Сообщается о выявленном видовом составе грибов обладающих различной степенью паразитизма.

Л.С. Дроздовская, В. И. Посырев (1980) изучали болезни семян женьшеня. Исследования проводились на семенах женьшеня, выявлено около 15 видов грибов, относящихся к 10 родам. Наиболее вредоносны виды рр. *Fusarium*, *Alternaria*, которые вызывают гибель зараженных семян.

Применение фунгицидов в борьбе с болезнями лекарственных растений на некоторых из них недопустимы, например, наперстянка, у которой листья целиком идут на приготовление лекарства.

Некоторые патогенные организмы можно уничтожить при помощи специальной обработки семян лекарственных растений. Хорошие результаты обеспечивает правильная агротехника и обработка семян.

Из болезней мяты следует назвать вертициллезное увядание. Увядание приносит вред, снижая урожай масла. Пораженные растения могут погибнуть или потерять все листья. Результатом заболевания является сильное изреживание плантации мяты. Накоплению возбудителя в почве способствует выращивание мяты в течение ряда лет на одном месте.

Ржавчина также поражает мяту. В результате болезни снижается урожай масла. Для борьбы с ржавчиной рекомендуется проводить опыливание или опрыскивание серой, а также опрыскивание бордосской жидкостью. Некоторые фунгициды нельзя применять на мяте. Потому что остаток может попасть в масло. Наперстянка пурпурная - поражается антракнозом. Возбудитель болезни распространяется с семенами, он вызывает болезнь всходов. При обработке семян горячей водой (15 мин при 55°) все возбудители болезни погибали. Если можно уничтожить возбудителя болезни на семенах, то вопрос о получении здоровых плантаций мог бы считать разрешенным.

Таким образом, из литературных данных видно, что лекарственные растения поражаются многими грибными, вирусными и бактериальными болезнями. В связи с чем, наша цель - изучение распространения, вредоносности болезней лекарственных растений в условиях Узбекистана.

Список литературы

1. Дроздовская Л.С.., Посырев В.И..,//Растениеводство, реф. журнал.№8, 1980, стр. 18.
2. Дроздовская Л.С.., Лыман В.Е.., // Растениеводство, реф.журнал. №2, 1982, стр. 28.
3. Дроздовская Л.С.., Николаева В.Е.,. Беришвили Л.В. // Растениеводство, реф.журнал. № 6. 1984, стр. 24.
4. Курмуков А.Г., Белолипов И.В. Дикорастущие лекарственные растения Узбекистана. – Ташкент, Extremum Press, 2012 – 288 с.
5. Коновалов Д.А., Першков С.Р. Болезни календулы и ромашки // Сб.Трудов ВИЛАР. – 2002. - т.35. - С. 91.
6. Мартыновская Н.М.., Николаева Н.М.., // Растениеводство, реф. журнал, №6, 1987. стр.24
7. Морочковская Г.С., Перенай В.В. ., // Растениеводство, реф.журнал №3. 1983. стр. 22-23.
8. Спиридонова В.П.., Богарада А.П., Мартыновская Н.М. Защита лекарственных культур от вредителей, болезней и сорняков - М., 1986. - с.106-108.
9. Хринунова Э.Ф. // Растениеводство, реф.журнал № 8., 198, стр. 18
10. Эргашев А., Ахмедов У., Абзалов А., Юлчиева М., Азимбоев С. Практические занятия по технологии производства лекарственных растений. – Ташкент, 2010 – 128 с (узб.).

БОЛЕЗНИ И ПОРАЖАЕМОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ГРИБНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ

Холмуродов У.Э., Камилов Ш.Г., Халмурадов Э.А.
Национальный университет Республики Узбекистан,
Ташкентский государственный аграрный университет,
Узбекистан

Аннотация. В материале представлены данные по поражаемости лекарственных растениях: алтей лекарственный, ноготки аптечные, мята, ромашка, шалфей мускатный, пижма обыкновенная, тысячелистник обыкновенный и пустырник грибными заболеваниями. Проведенные обследования показали, что основными болезнями лекарственных растений в условиях Узбекистана являются мучнистая роса, ржавчина, фузариоз и на некоторых культурах встречаются пятнистости. Так, мучнистая роса встречалась почти на всех культурах, где максимальная поражаемость отмечалась на ромашке – 16,2 %, затем идут мята (15,4%), пижма (12,2%). Остальные виды поражались менее 10% случаев.

Ржавчиной растений поражались 5 из 7 видов растений. Максимальное поражение отмечалось у тысячелистника – 21,9%, следом идут – мята (18,6%), ромашка (16,5%).

Ключевые слова: лекарственные растения, грибные болезни, поражаемость, мучнистая роса, ржавчина, фузариоз

Введение

Получение высококачественного лекарственного сырья - важнейшая задача лекарственного растениеводства, успешное решение которой в значительной степени зависит от максимального сокращения потерь урожая от вредных организмов.

Лекарственные растения играют сегодня значительную роль в здравоохранение их удельный вес в арсенале лекарственных средств достаточно велик. Их сбором выращиванием и переработкой заняты многочисленные государственные и кооперативные организации. Вместе с тем постоянно ведутся научные исследование в области изучения старых и открытия новых лекарственных растений, эти исследования привели к ряду весьма важных для человечества открытий.

Приоритетным направлением в защите лекарственных культур от вредных организмов является разработка интегрированных систем, представляющих научно-обоснованный комплекс организационно - хозяйственных, агротехнических, биологических и химических методов и средств, направленных на снижение численности и вредоносности вредителей, болезней и сорняков. Данные системы строятся на основе знания видового состава вредителей и болезней, а также биологических особенностей культур и технологии их возделывания.

Изучение состава и вредоносности болезней на лекарственных культурах имеет большое значение, т.к. именно этим определяется необходимость проведения защитных мероприятий.

Лекарственные растения подвергаются многочисленным заболеванием. По литературным данным установлено, что лекарственные растения поражаются такими болезнями, как мучнистая роса, ржавчина, различные пятнистости и корневые гнили, которые наносят большой урон не только урожаю, но и ухудшают качество получаемой продукции.

На других культурах в борьбе с этими болезнями широко применяют химические средства защиты растений. Изучаемые нами культуры являются лекарственными и в борьбе с болезнями и вредителями этих культур следует применять экологически чистые средства. Однако, в ряде случаев невозможно устранить потери от болезней и вредителей без применения химических средств защиты. Химический метод совершенствуется в направлении использования быстро разлагающихся и малотоксичных для человека препаратов.

Литературный обзор

По вопросу поражаемости болезнями лекарственных растений данные отечественной литературы ограничены, они нуждаются в тщательном анализе. Согласно изученным литературным источникам, на возделываемых лекарственных растениях встречаются заболевания. Так, Х.Х.Холматов, А.И.Косимов, (1994) отмечали болезни травянистых лекарственных растений культивируемых в специализированных хозяйствах республики. В работе Ш.Камилова, М.Хужаназаровой, Г.Халмуминовой (2021) приводятся данные по встречаемости и развитию болезней на лекарственных травянистых растений произрастающих в Зааминском национальном парке.

Исходя из вышеотмеченного актуальность данного направления видится весьма актуальной.

В задачу наших исследований входит изучение влияния обработки семян и взрослых лекарственных растений препаратами с целью уменьшения поражаемости всходов корневыми гнилями и другими заболеваниями.

В связи с чем, мы решили провести научно исследовательскую работу по этому вопросу. Для этого необходимо изучить некоторые вопросы биологии возбудителей болезней лекарственных растений для изыскания мер борьбы с ними.

Нами с 2021 года проводятся исследования по изучению состава и поражаемости разных видов лекарственных растений грибными болезнями в условиях Узбекистана. Наблюдения проводились в Ботаническом саду АН РУз, в лаборатории лекарственных растений.

Материал и методы исследования

Исследования проводились в 2020 – 2022 гг. в лабораторных и полевых условиях на культивируемых лекарственных растениях в Ботаническом саду АНРУз, в лаборатории лекарственных растений

Объектами исследования являются пораженные растения. Сбор материала осуществлялся методом маршрутных обследований в течении всего вегетационного периода с момента появления всходов.

Идентификация проводилась по определителям (Васильевский, Каракулин, 1937, 1950, Головин, 1960, Литвинов, 1969, Билай, 1977, Пидопличко, 1977-1978, Ульянищев, 1978), а также по региональной микологической сводке – «Флора грибов Узбекистана» (1983-1997).

Результаты исследований

Алтей лекарственный - *Althaea officinalis*. Алтей поражается многими грибковыми заболеваниями: антракноз – *Colletotrichum malvarum* (Br. et Casp) Southw; аскохитоз – *Ascochyta malvicola* Sacc; ржавчина – *Puccinia malvasearum* Mont.; септориоз – *Septoria lachastrana Sacc*.et Lab.: церкоспороз

– *Cercospora polymorpha* Bul.

Антракноз на алтее развивается в виде листовой и стеблевой формы. В первом случае на листьях появляются округлые пятна, чаще неправильной формы, во втором на стеблях образуются язвы.

Аскохитоз поражает молодые растения первого года жизни. На листьях появляются округлые или неправильные пятна, по высыхании серые, с темно-пурпуровым ободком.

Ржавчина проявляется преимущественно на нижней стороне листьев в виде округлых, мелких, беспорядочно расположенных, охряно-бурых пустул, состоящих из одноклеточных округлой формы урединиоспор с буроватой оболочкой.

При поражении алтея септориозом на листьях появляются темно-бурые, неправильные, высыхающие маленькие пятна.

На алтее в условиях Узбекистана было обнаружено фузариозное увядание. При заболевании фузариозом корни алтея загнивают, листья уменьшаются в размере, желтеют, засыхают, все растение увядает и погибает.

Ноготки аптечные – *Calendula officinais* L Ноготки аптечные поражаются ризоктониозом, мучнистой росой, ржавчиной, церкоспорозом и рамуляриозом.

Всходы во влажных условиях довольно сильно поражаются ризоктониозом – *Rhizoctonia solani* Kuhn. Поражаются корни и основание стебля, которые утончается, буреют и загнивают, вследствие чего рассада высыхает и погибает. На пораженных частях появляется бурый плотный налет мицелия с мелкими черными склероциями.

Мучнистой росой поражаются листья ноготков. Возбудителем, является гриб *Sphaerotheca fuliginea* Poll *f. calendulae* Jacz. На листьях появляется налет, состоящий из грибницы и конидиальных спороношений, слаборазвитый, более или менее обильный, паутинистый, мучнистый белый. Конидиальная стадия обильная. К осени появляются темно-коричневые, шаровидные клейстотеции.

Ржавчину вызывает *Puccinia flaveriae* Jack. Поражаются листья, на которых образуются светло-коричневые пятна. На нижней стороне листа наблюдаются непорошащие пустулы.

При поражении листьев ноготки рамуляриозом - *Ramularia sp.* появляются желто-бурые, округлые, 0,3-0,8 см в диаметре пятна. Конидиеносцы с обеих сторон листа в виде сероватого налета.

Церкоспороз вызывает гриб – *Cercospora calendula*e *Sacc.*, вызывающий на листьях с обеих сторон листа округлые сероватые пятна с темной оливково-фиолетовой каймой, в центре которых появляется спороношение микромицета.

Мята – *Mentha piper*ita L. Мята в основном поражается фузариозом, ржавчиной, мучнистой росой и различными пятнистостями - септориоз, рамуляриоз, филлостиктоз.

При поражении мяты фузариозом *Fusarium spp.* стебли у корневой шейки темнеют и загнивают. Все растение вянет, и засыхают. Болезнь встречается повсеместно. Больные растения выявляются в течение всего вегетационного периода.

Ржавчина – *Puccinia menthae* Pers. - распространена повсеместно в районах культивирования этого растения. Признаки ржавчины на мяте появляется в начале мая на нижней поверхности листьев. Пораженные листья, стебли часто искривляются, а листья деформируются, желтеют и преждевременно опадают. Развитию заболевания благоприятствуют высокая влажность и температура воздуха. Эцидиальная, или весенняя стадия гриба появляется на листьях и стеблях отрастающих побегов мяты в виде беловатых, а затем золотисто-желтых подушечек эцидий. Образующиеся в эцидиях споры разносятся ветром на соседние здоровые растения. Через 13-15 дней после заражения спорами из эцидий на нижней стороне листьев появляются бурые подушечки летней стадии гриба-уредопустулы со спорами.

Мучнистая роса - *Erysiphe cichoracearum* DC.*f. menthae* Jacz. наносит большой ущерб. Болезнь характеризуется появлением на листьях паутинообразного беловатого налета состоящего из мицелия конидиеносцев и спор гриба. Первые признаки болезни в наших условиях появляются в конце июня в начале июля. К осени на поверхности налета образуются коричневые шаровидные плодовые тела – клейстотеции. Развивающийся на листьях налет затрудняет доступ к ним воздуха и света, что приводит к постепенному угнетению растений, а при сильном развитии к полному засыханию листа. Перезимовывает гриб плодовыми телами на пораженных остатках растений.

Ромашка – *Matricaria chamomile* L. Ромашка аптечная в наших условиях в основном поражается мучнистой росой, ржавчиной и фузариозом. При поражения фузариозом корни ромашки обесцвечиваются и загнивают, листья уменьшаются в размере, желтеют, засыхают, все растение увядает и погибает.

Возбудителем мучнистой росы ромашки аптечной является *Erysiphe cichoracearum* DC. В первую очередь мучнистый налет отмечается на нижних листьях. Налет развивается преимущественно на верхней стороне листа.

Возбудителем ржавчины является *Puccinia anthemidis* Syd. На стеблях и листьях образовываются бурые плотные непорошашие пустулы. Сильно пораженные растения засыхают.

Шалфей мускатный – *Salvia selarea* L. Шалфей мускатный в основном поражается: овуляриозом, септориозом, мучнистой росой, ложной мучнистой росой и фузариозным вилтом.

Овуляриоз – *Ovularia ovata Sacc.*, заболевание вызывает большие округлые пятна, буроватые, очерченные, с нижней стороны покрытые белым нежным налетом спороношения гриба. Благоприятными условиями, для развития болезни, являются не сильно высокие температуры и повышенная влажность, вследствие чего, в условиях Узбекистана, заболевание часто встречается в предгорных и горных районах.

Септориоз – *Septoria salvia*e var. *sclarea* Mass. – характеризуется образованием на листьях бледно—коричневой мелкой нередко-ограниченной пятнистости неправильной формы. Пятна часто сливаются. На них с верхней стороны и реже с нижней стороны листьев формируются сначала светло-коричневые, позже черные пикниды.

Возбудителем мучнистой росы шалфей мускатного является *Erysiphe labiatarum* Chev.f.*salvia*e Jacz. Болезнь проявляется на обеих сторонах листа. Налет грибницы бледный, слабо заметный. Пораженные листья желтеют и усыхают. При усыхании листьев в начале осени на налете обнаруживаются мелкие черные образования в виде точек – клейстокарпии.

Ложная мучнистая роса – *Peronospora swinglei* Ell. et Kell. Поражаются главным образом нижние листья, на которых с верхней стороны заметны желтоватые, затем буреющие пятна, а с нижней – заметный сероватый налет. В условиях Узбекистана встречается часто, благоприятными являются весенние месяцы, с невысокими температурами и повышенной влажностью.

Пижма обыкновенная – *Tanacetum vulgare* L. – многолетнее травянистое растение. На пижме обыкновенной были отмечены следующие болезни: фузариум, ржавчина и мучнистая роса.

Тысячелистник обыкновенный - *Achillea millefolium L.* Тысячелистник обыкновенный оказался более устойчивыми к различными заболеваниям в наших условиях. Наблюдалось поражение мучнистой росой, ржавчиной и в слабой степени альтернариозом. Возбудителем мучнистой росы является *Erysiphe cichoracearum* DC *f. achilleae* Jacz., ржавчины – *Puccinia achillea*e Cke и альтернариозом *Alternaria alternate* (Fr.) Keisser.

Пустырник – *Leonurus cardiaca* L. В наших условиях пустырник поражается фузариозом и альтернариозом.

Также, авторами изучалась поражаемость изучаемых растений основными, наиболее вредоносными грибными болезнями (табл.1). Проведенные обследования показали, что основными болезнями лекарственных растений в условиях Узбекистана являются мучнистая

роса, ржавчина, фузариоз и на некоторых культурах встречаются пятнистости.

Таблица 1. Поражаемость травянистых дикорастущих лекарственных растений болезнями (2020-2022 г.г.).

Растения	Поражаемость				
	фузариоз	мучнистая роса	ржавчина	альтернария	септориоз
Мята	4,2	15,4	18,6	-	6,2
Пустырник	10,0	-	-	3,7	-
Пижма	-	12,2	7,8	-	-
Календула	-	7,5	7,9	-	-
Ромашка	7,1	16,2	16,5	-	-
Шалфей	6,1	9,3	-	-	8,9
Тысячелистник	-	1,8	21,9	-	4,2

Из приведенной таблицы видно, что основными болезнями травянистых дикорастущих лекарственных растений является мучнистая роса и ржавчина.

Так, мучнистая роса встречалась почти на всех культурах, где максимальная поражаемость отмечалась на ромашке – 16,2 %, затем идут мята (15,4%), пижма (12,2%). Остальные виды поражались менее 10% случаев.

Ржавчиной растений поражались 5 из 7 видов растений. Максимальное поражение отмечалось у тысячелистника – 21,9%, следом идут – мята (18,6%), ромашка (16,5%).

Полученные данные могут быть использованы в практической работе по защите лекарственных растений в специализированных хозяйствах Узбекистана, т.к. известно, что по вопросу поражаемости лекарственных растений болезнями данные отечественной литературы весьма ограничены.

Выводы

1. На 7 видах травянистых растений отмечено развитие 21 вида фитопатогенных грибов.
2. Основными болезнями лекарственных растений в условиях Узбекистана являются мучнистая роса, ржавчина, фузариоз и на некоторых культурах встречаются пятнистости.

Список литературы

1. Билай В.И. Фузарий – Киев, изд.АНУ, 1977 – 441 с.
2. Василевский Н.И., Каракулин Б.П. Паразитные несовершенные грибы. т.I, Гифомицеты- М.-Л., Изд.АН СССР, 1937 – 256 с; т II, Меланкониевые. - М.-Л., Изд.АН СССР, 1950 – 517 с.
3. Головин П.Н. Мучнисторосяные грибы, паразитирующие на культурных и полезных диких растениях. – М.-Л., АН СССР, 1960 – 266 с.
4. Камилов Ш., Хужаназарова М.К., Халмуминова Г.К. Болезни лекарственных растений./Мат.конф.Oziq-ovqat xavfsizligida o'simliklar himoyasining innovatsion texnologialari. Xalqaro ilviy-amaliy anjuma, 2021 yil 1 iyul, II (2) –Тошкент, - с.220-226.
5. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. – Л., 1967 – 174 с.
6. Пидопличко Н.М. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель. Т. I-III, - Киев, Наукова Думка, 1977-1978.
7. Ульянищев В.И. Определитель ржавчинных грибов СССР. Ч «. – Л.,Наука, 1978. – 384 с.
8. Флора грибов Узбекистана. В I-VII томах. – Ташкент, Фан, 1983-1997
9. Холматов Х.Х., Косимов А.И.Доривор усимликлар (Маълумот нома). -Ташкент.,Ибн Сино, 1994. - 366 с. (узб.)

КОНТРОЛЬ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫЙ ВО ВНИИ ФИТОПАТОЛОГИИ

Коломиец Т.М., Киселева М.И., Пахолкова Е.В., Глинушкин А.П.
ВНИИ фитопатологии (ВНИИФ), Большие Вяземы

На современном этапе развития общества обеспечение продовольственной безопасности территории Российской Федерации приобретает все большую актуальность, становясь одной из ключевых проблем глобального характера. Несмотря на то, что изучению продовольственной безопасности и различным аспектам благосостояния населения уделено достаточно внимания, многие вопросы этой проблемы остаются не достаточно решенными. Одним из таких вопросов является контроль биобезопасности стратегически важных сельскохозяйственных культур.

Указ Президента Российской Федерации от 21 января 2020 года N 20 о продовольственной безопасности Российской Федерации предусматривает необходимость новых современных подходов к популяционно-генетическим исследованиям возделываемых культур.

Для обеспечения продовольственной безопасности страны во ВНИИФ в 1958 году была организована первая в стране лаборатория генетики фитопатогенных грибов. Задачей лаборатории, как и задачей института, была разработка эффективной системы защиты от оружия массового поражения основных, стратегически важных продовольственных сельскохозяйственных культур, уничтожение которых могло нанести серьезный ущерб экономике и продовольственной безопасности страны. Такими культурами среди зерновых являются, в первую очередь, пшеница, рожь, рис и другие.

Основной целью исследований на протяжении нескольких десятилетий являлся контроль за появлением новых рас и генов вирулентности, необходимый для обеспечения продовольственной безопасности и опережающей селекции на иммунитет к вредоносным болезням.

В результате многолетних исследований в ФГБНУ ВНИИФ получены результаты многолетних исследований структуры популяций и динамики генов вирулентности возбудителя бурой ржавчины [1, 2, 3]. Прослежена сопряжённая эволюция генов вирулентности возбудителя бурой ржавчины пшеницы с генами устойчивости возделываемых сортов. Определены эффективные гены устойчивости к бурой ржавчине и пирикуляриозу риса в различных регионах России [1, 4].

Определены ареалы распространения основных видов возбудителей септориоза пшеницы на территории России. Разработаны методы оценки патогенных свойств штаммов *P. nodorum* и *Z. tritici*, а также принципы их отбора в состав искусственных инфекционных фонов при оценке сортов на устойчивость к болезням [5, 6, 7]. Проводятся исследования генетической структуры региональных популяций *Z. tritici* на территории России, что позволяет оценить эффективность известных генов устойчивости по отношению к местным популяциям гриба, а также отбирать наиболее вирулентные штаммы для использования их в составе искусственного инфекционного фона при проведении иммунологических исследований [7, 8].

Позднее расширился круг изучаемых биообъектов, начали проводиться исследования видовой и внутривидовой структуры популяций возбудителей фузариоза, гельминтоспориозных пятнистостей, корневой гнили и других болезней зерновых культур [9, 10, 11]. В течение длительного времени в институте проводились исследования по биоконтролю сорных растений [12, 13].

На основании популяционно-генетических исследований во ВНИИФ создана Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов, в которую вошли порядка 5000 штаммов возбудителей наиболее опасных болезней сельскохозяйственных культур, включающих грибы, бактерии,

вирусы и вироиды. На базе коллекции создан Центр коллективного пользования (ЦКП) «Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и сортов растений-идентификаторов патогенных штаммов микроорганизмов», оборудованный современными приборами для хранения и поддержания микроорганизмов. В результате проведения популяционных исследований в различных регионах РФ коллекция ежегодно пополняется новым биоматериалом. В ГКФМ применяются современные методы хранения биоматериала, в том числе криоконсервация и лиофилизация; периодически проводится проверка жизнеспособности, патогенности, фитотоксичности, генотипа вирулентности и ряда других свойств [14, 15, 16, 17, 18].

Для дальнейшего обеспечения биобезопасности необходимо усилить проведение популяционно-генетических исследований в следующих направлениях:

- Контроль видовой и внутривидовой изменчивости наиболее вредоносных патогенов.
- Генотипирование ДНК самых различных микроорганизмов с применением микросателлитного анализа – составление генетических карт сцеплений генома.
- Выявление потенциально-опасных рас и генов вирулентности с целью идентификации эффективных генов устойчивости к болезням на территории России.
- Выявление заносной инфекции для предотвращения биотерроризма и обеспечения продовольственной безопасности.
- Определение влияния биотических и абиотических факторов на формирование популяций патогенных организмов.
- Создание генетического банка возбудителей наиболее опасных болезней, характеризованных по морфологическим признакам, патогенности и генотипу вирулентности для использования в опережающей селекции на иммунитет к вредоносным болезням и обеспечении продовольственной безопасности страны в случае применения биологического оружия.

Список литературы

1. Жемчужина А.И., Киселева М.И., Коломиец Т.М., Жемчужина Н.С. Генотип вирулентности популяций *Puccinia tritici*na и степень эффективности различных генов устойчивости против *P. tritici*na в различных регионах России // Сельскохозяйственная биология. – 2016.

2. Жемчужина А.И., Афонина С.В. Вирулентность популяций возбудителя *Puccinia tritici*na Erikss. на территории Центрального и Северо-Кавказского регионов России в 2013 году // Сборник Национальной

Академии микологии "Современная микология в России". – 2015. – Т. 5. – С. 168-170.

3. Жемчужина Н.С., Киселева М.И., Жемчужина А.И., Елизарова С.А. Жизнеспособность и вирулентность возбудителя бурой ржавчины пшеницы (*Puccinia tritici*na Eriks.) при долгосрочном хранении // Сельскохозяйственная биология. – 2019. –Т. 54. – №3. – С. 597-606.

4. Коломиец Т.М., Панкратова Л.Ф. Внутривидовая изменчивость возбудителя пирикуляриоза риса – M.grizea северокавказской популяции по генотипу вирулентности // Материалы 10-ой Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем». / ФГБНУ ВНИИБЗР, г. Краснодар (11-14 сентября 2018 г.). – 2018. - С. 339 - 342.

5. Санина А.А., Анциферова Л.В. Видовой состав грибов рода *Septoria Sacc.* на пшенице в европейской части СССР // Микология и фитопатология. – 1991. - т.25. - вып. 3. - С. 250-252.

6. Санина А.А. Физиологическая специализация *Septoria tritici* Rob. et Desm. // Микология и фитопатология. – 1991. – Т. 25. - 4. - С. 338-342.

7. Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н., Куркова Н.А. Генетическая структура региональных популяций *Mycosphaerella* graminicola (*Septoria tritici*) – возбудителя септориоза пшеницы // Сельскохозяйственная биология. – 2016. - Т. 51. - № 5. – С. 722-730.

8. Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н. Частота встречаемости потенциально опасных рас в региональных популяциях Zimo*septoria tritici* на посевах пшеницы // Аграрная наука (специальный выпуск к Международной научно-практической конференции «Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям», посвященной 100-летию монографии Н.И. Вавилова). – 2019. – Т.1. – С. 99-103.

9. Коломиец Т.М., Киселева М.И., Жемчужина Н.С., Панкратова Л.Ф., Елизарова С.А. Особенности видового состава патогенных грибов рода *Fusarium* в биоценозах кукурузы Воронежской области (A characteristic of the species composition of pathogenic fungi of the genus *Fusarium* in corn biocenoses of the Voronezh region) // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022. 26(6):583-592/ DOI 10.18699/VJGB-22-71

10. Жемчужина Н.С., Коломиец Т.М., Киселева М.И., Панкратова Л.Ф. Патогенность и фитотоксичность штаммов *Bipolaris sorokiniana* (*Sacc.*) Shoem. на зерновых культурах // Материалы Пятого Съезда Микологов России (12-14 октября 2022 г., г. Москва), в сборнике: Современная микология в России.-2022.- Т 9.- стр. 333-335. doi:10.14427/cmr.2022.ix.08

11. Коломиец Т.М., Панкратова Л.Ф. Патогенный комплекс возбудителей корневой гнили пшеницы в разных регионах России // Защита и карантин растений. -2016, № 2/ - с. 37-40.

12. D. K. Berner, E. L. Smallwood, M. Vanrenterghem, C. A. Cavin, J. L. Michael, B. A. Shelley, T. Kolomiets, L. Pankratova, W. L. Bruckart, Zh. Mukhina. Some dynamics of spread and infection by aeciospores of *Puccinia* punctiformis, a biological control pathogen of Cirsium arvense // Biological Control. – 2015. – Vol. 88. – P. 18-25.

13. D. Berner, A. Lagopodi, J. Kashefi, Zh. Mukhina, T. Kolomiets, L. Pankratova, D. Kassanelly, C. Cavin, E. Smallwood. Field assessment, in Greece and Russia, of the facultative saprophytic fungus, *Colletotrichum* salsolae, for biological control of Russian thistle (Salsola tragus) // Biological Control. – 2014. – Vol. 76. – P. 114-123.

14. Дубовой В.П., Жемчужина Н., Елизарова С., Горелов П. Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов ВНИИФ // Аналитика. 2016; 1: 76-78. eLIBRARY ID: 25623093, ISSN: 2227-572X, eISSN: 2687-1351.

15. Kolomiets T., Zhemchuzhina N. Genetic resources of the State Collection of Phytopathogenic Microorganisms of the All-Russian Research Institute of Phytopathology (ARRIP). In: Conference proceedings of XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collection Organisation, Moscow, 13-15 September 2018; 45-46. DOI: 10.18699/PlantGen2019-002.

16. Коломиец Т.М., Жемчужина Н.С., Панкратова Л.Ф., Александрова А.В., Киселева М.И., Елизарова С.А. Микромицеты Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов, вызывающие микозы и микотоксикозы человека и животных. В: Успехи медицинской микологии. М., 2018; 19: 371-372. eLIBRARY ID: 35094162, ISSN: 2310-9467.

17. Коломиец Т.М., Жемчужина Н.С., Киселева М.И., Пахолкова Е.В., Глинушкин А.П. Роль генофонда Государственной Коллекции фитопатогенных микроорганизмов ВНИИ фитопатологии в обеспечении научных исследований // Материалы Пятого Съезда Микологов России (12-14 октября 2022 г., г. Москва), в сборнике: Современная микология в России.- 2022.- Т 9.- стр. 10-12. doi: 10.14427/cmr.2022.ix.01

18. Пахолкова Е.В., Сальникова Н.Н. Влияние разных способов длительного хранения на патогенность коллекционных штаммов возбудителей септориоза *P. nodorum* и *Z. tritici* // Материалы Пятого Съезда Микологов России (12-14 октября 2022 г., г. Москва), в сборнике: Современная микология в России.-2022.- Т 9.- стр. 299-301. doi: 10.14427/cmr.2022.ix.08

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В СИСТЕМЕ «РАСТЕНИЕ-ХОЗЯИН – ПАТОГЕН»

Сенашова В.А., Анискина А.А., Полякова Г.Г.
Институт леса им. В. Н. Сукачева, Красноярск

Микроорганизмы, ассоциированные с растением-хозяином, могут играть как положительную (являться источником дополнительных питательных веществ, выполнять защитную функции), так и отрицательную (инициировать патологический процесс) роли в его жизни. В большинстве случаев фитопатологическими агентами являются грибы, реже бактерии.

Фитопатогенные грибы являются важнейшим фактором, определяющим состояние хвойных лесов. Во время инфекционного процесса болезнетворный организм вызывает у растения физиолого-биохимические нарушения, приводящие к различным анатомо-морфологическим изменениям, что влияет на синтез вторичных метаболитов [Полякова, 2002] и, как следствие, на количественный и качественный состав эпифитного сообщества.

Рассматривая растительный организм, как систему «эпифитные микроорганизмы – растение-хозяин – патоген» наше внимание сконцентрировалось на сопряженном развитии этих компонентов через взаимодействие фитопатогенов, эпифитных микроорганизмов и вторичных метаболитов растений, в частности летучих соединений.

Применяли стандартные микробиологические, фитопатологические и биохимические методы исследования. Компонентный состав летучих соединений хвойных изучали с применением методов хромато-масс-спектрометрии. Фитонцидную активность изучали методом Токина, адаптированным к условиям эксперимента.

На территории средней Сибири поражения филлосферы хвойных видов преимущественно вызываются факультативными сапротрофами, однако встречаются и облигатные паразиты (ржавчинные грибы). Многолетнее изучение видового разнообразия фитопатогенных микромицетов филлосферы хвойных на территории Средней Сибири выявило представителей 26 родов, относящихся к различным систематическим группам: *Lophodermium* Chevall., *Lophodermella* H hn., *Cyclaneusma* DiCosmo, Peredo & Minte, *Gremmenia* Korf., *Hypodermella* Tubeuf, Lirula Darker, Sarea Fr., *Herpotrichia* Fucke, *Gremmeniella* M. Morelet, *Durandiella* Seaver, *Coleosporium* L v., *Chrysomyxa* Unger, *Melampsora* Castagne, *Melampsorella* J. Schr t., *Pucciniastrum* G.H. Otth., *Cronartium* Fr., Rhizosphaera L. *Mangin* & Har, Pestalotia De Not., *Sclerophoma* H hn. (телеоморфа – *Sydowia* Bres.), *Sphaeropsis Sacc.* (=*Botryosphaeria* Ces. & De Not.) *Stagonospora* (*Sacc.*) *Sacc.* (=*Hendersonia*

Berk.), *Lecanosticta* Syd., *Dothistroma* Hulbary, Meria Vuill. (телеоморфа – Rhabdocline Syd.), *Alternaria* Nees, *Cladosporium* Link, *Septorioides* Quaedvl., Verkley & Crous [Сенашова и др., 2021]. К наиболее распространенным инициаторам патологического процесса можно отнести аскомицет Loph. *seditiosum* Minter, Staley & Millar, сопутствующий всему ареалу сосны (Pinus L.), и базидиомицет *Melampsorella caryophyllacearum* (Chroet.), вызывающий ржавчинный рак – системное заболевание пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb).

Поскольку эпифитные микроорганизмы играют важную роль в жизни растения-хозяина, нашу работу по изучению процессов в системе «растение-хозяин – патоген» мы начали со сравнения эпифитных сообществ здоровой филлосферы основных видов хвойных Сибири и пораженной различными заболеваниями. Изучен количественный состав и основные группы микроорганизмов¬, входящих в эпифитный комплекс здоровой и пораженной грибами-патогенами хвои сеянцев и взрослых деревьев в Средней Сибири. Установлено, что здоровая филлосфера каждого вида растения обладает своеобразным эпифитным сообществом. При отмирании хвои, вызванном факультативными сапротрофами (стадия формирования и созревания апотециев), различия нивелируются: эпифитные комплексы имеют близкий микробный состав в количественном и качественном аспектах. [Сенашова, 2012, Сенашова, Гродницкая, 2015]. Подобная закономерность прослеживалась и при изучении микробных комплексов хвои пихты сибирской, пораженной ржавчинным раком. Противоположная картина наблюдалась при ржавчинном заболевании хвои лиственницы сибирской (Larix *sibirica Ledeb.*) (возбудитель *Melampsora larici*-populina Kleb.): общая численность микроорганизмов, выделенных с больных хвоинок, оказалась меньше, чем со здоровых, поскольку паразит оказывает стимулирующее действие на растение-хозяина, приводящее к увеличению фитонцидной активности хвои и, как следствие, снижению численности эпифитных микроорганизмов. Стоит отметить, что стадия развития *Mel. larici*-populina на хвое лиственницы ограничена примерно 1,5 месяцами, и при конкуренции за питательные вещества, которые при эпифитном способе существования весьма ограничены, тактика патогена, направленная на повышение фитонцидности, оправдана. У гриба *M. caryophyllacearum* спороношение же растянуто в течение всего периода вегетации, что нивелирует фитонцидные свойства больных побегов [Сенашова и др., 2012; Сенашова, 2014].

На примере *M. caryophyllacearum* показано влияние облигатного паразита на компонентный состав летучих соединений, выделяемых

филлосферой. Данный патоген вызывает у пихты ржавчину хвои, образование «ведьминых метел» и раковых ран. За период с мая по сентябрь включительно выявлены 75 соединений в образцах здоровой хвои и 47 в образцах хвои, пораженной ржавчинной. Обнаружены 24 вещества, являющиеся общими как для контрольных, так и для опытных образцов: монотерпены (трициклен, -пинен, -пинен, -фелландрен, -фелландрен, камфен, 3-карен, о-цимен, лимонен, терпинолен), сесквитерпены (юнипен, кариофиллен, -кариофиллен, -лонгипинен, -химачален, -селинен, -бисаболен), спирты (борнеол, фитол, -бисаболол, транс-неролидол), эфиры (борнилацетат, геранилацетат) и алкан (эйкозан). При поражении ржавчиной наблюдается уменьшение процентного содержания большинства летучих соединений в пробе по сравнению с контролем. Идентифицированы соединения, характерные только для здоровой и только для больной хвои. Среди специфических соединений здоровой хвои преобладал -мирцен, а у хвои с «ведьминых метел» — биформен.

Выявлены различия в содержании полимерных фенольных соединений (проантоцианидинов) в связанной и свободной формах в здоровых тканях хвои и зараженной *M. caryophyllacearum*. Обнаружено, что хвоя пихты, зараженная ржавчиной, обладает пониженной фитонцидной активностью по отношению к эпифитным микромицетам, но оказывает выраженное бактериостатическое воздействие на бактерии (включая актиномицеты).

Чтобы понять, какие изменения происходят с растением на начальном этапе патологического процесса мы провели искусственное заражение сеянцев сосны обыкновенной факультативным сапртрофом Loph. *seditiosum*. Образцы растительных тканей (хвоя, корни) отбирали на стадии прорастания аскоспоры (формирования некротического пятна).

На начальной стадии инфекционного процесса, вызванного факультативным сапротрофом *L. seditiosum* в газовой фракции хвои происходит увеличение количества компонентов летучих соединений за счет спиртов (фенилэтилового, транс-пинокарвеола) и кетона (пинокарвона). В газовой фракции корней, напротив, происходит снижение количества веществ. Контрольные пробы хвои характеризуются повышенным содержанием ряда моно- и сесквитерпенов и некоторых спиртов, пробы корней – дитерпенов и спиртов.

Изменения компонентного состава летучих соединений привели к различиям фитонцидной активности изучаемых сеянцев. Сеянцы сосны, подвергшиеся заражению, обладают в целом более выраженными фитонцидными свойствами относительно контрольного варианта. Это подтверждают и результаты микробиологических посевов. Так, максимальное значение суммарной (общей) численности микроорганизмов

на поверхности хвои отмечено в контрольном варианте. При этом наблюдаются различия в соотношениях групп микроорганизмов. Так, в контрольном варианте доминируют неспоровые бактерии, в опытном – дрожжевые формы грибов. Минорным компонентом являлись актиномицеты.

Максимальное значение общей численности микроорганизмов на поверхности корней и в зоне ризосферы сеянцев сосны отмечено также в контроле, во всех вариантах преобладали неспоровые бактерии.

Изменения, наблюдающиеся у растения-хозяина на ранней стадии развития факультативного сапротрофа *L. seditiosum*, соответствуют адаптационному синдрому Селье: активации физиологических процессов на раннем этапе неблагоприятного воздействия, сменяющейся истощением организма, если нагрузка продолжается.

Таким образом, характер изменений в системе «растение-хозяин – патоген» определяется особенностями жизненного цикла патогена и стадией инфекционного процесса. Развитие патогенного организма влияет не только на изменение компонентного состава летучих соединений, выделяемых растением, но и на синтез ряда вторичных метаболитов в тканях растения-хозяина.

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ 15-04-06575.

Список литературы

1. Полякова Г. Г. Физиологические механизмы противоинфекционной защиты пихты // Лесоведение. 2002. № 4. С. 25–30.

2. Сенашова В. А., Шилкина Е. А., Сафронова И. Е. Фитопатогенные микромицеты, ассоциированные с хвойными растениями на территории Средней Сибири // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2021. Вып. 236. С. 129–151.

3. Сенашова В. А. Фитопатогенные микромицеты филлосферы хвойных насаждений Средней Сибири. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2012. 104 с.

4. Сенашова В. А., Гродницкая И. Д. Индикационные свойства микроорганизмов при мониторинге состояния хвойных // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2015.Вып. 211. С. 230–242.

5. Сенашова В. А., Громовых Т. И., Сорокин Н. Д. Эпифитная микрофлора здоровой и пораженной хвои древесных пород Средней Сибири // Лесоведение. 2012. № 4. С. 24–30.

6. Сенашова В. А. Влияние биотических факторов на формирование эпифитного сообщества пихты сибирской // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2014. Вып. 207. С. 171–179.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПОСЕВНЫЕ КАЧЕСТВА И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФАСОЛИ ЗАЛОТИСТОЙ (МАШ)

Сухоруков А.И., Авакумов А.Д.
РГАУ МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

Маш – одна из распространенных бобовых культур в Азии, редко встречающаяся в нашей стране. Это очень перспективная культура, в семенах которой содержится большое количество белка, витаминов группы В, РР и С. Крахмал маша имеет низкий гликемический индекс, что делает его диетическим продуктом [1]. Еще одно преимущество фасоли золотистой состоит в том, что она дает зеленую массу, пригодную для скармливания скоту, в отличие от распространенной в России фасоли обыкновенной [2]. Все это делает маш перспективной пищевой и кормовой культурой, которая так же, как и все бобовые, способствует поддержанию уровня азота в почве на постоянном уровне.

Маш, как и другие малораспространенные культуры, нуждается в проработке и корректировке существующих методик возделывания с целью обеспечения высокой продуктивности. Учитывая текущую экологическую обстановку, наиболее оптимальным вариантом является применение биологических стимуляторов роста, в частности, бактериальных препаратов. Их применение является одним из наиболее эффективных приемов повышения продуктивности растений и качества урожая, позволяющим сохранить естественное плодородие почв и экологическое равновесие окружающей среды.

Материалы и методы исследования. В исследовании использовались семена фасоли золотистой *Vigna radiate* сорта Победа 104 и бактериальные препараты «Экобактер терра» и «Байкал ЭМ-1», в состав которых входят молочнокислые, фотосинтезирующие и фиксирующие азот бактерии, сахаромицеты и культуральная жидкость.

Для определения энергии прорастания по ГОСТ [3] были взяты пробы по 50 семян на каждый вариант, а именно контроль, обработка препаратом Экобактер терра, обработка препаратом Байкал ЭМ-1. Контроль замачивался в воде в течение часа, опытные в варианты – в описанных выше препаратах также в течения часа. Концентрация препаратов в обоих случаях составляла пять капель на 200 мл воды. После замачивания семена были разложены по 25 штук на фильтровальную бумагу в чашки Петри и оставлены на 3-е суток для дальнейшего анализа. Опыт проводился в двухкратной повторности.

Опыт также включал в себя посев семян, обработанных описанным выше образом, по три штуки в пластмассовые контейнеры в питательный

грунт, в качестве котоорого использовался субстрат на основе верхового торфа «Агробалт-С», в 3-х вариантах: контроль, замоченные в «Экобактер терра» и замоченные в «Байкал ЭМ-1». Каждый вариант был представлен тремя повторностями. Спустя две недели с момента посева были проведены анализы на содержание нитратов и пигментов. Нитраты определялись ионометрическим методом, для работы с которым растения извлекались из грунта, отмывались, измельчались в ступке с добавлением алюмокалиевых квасцов в пропорции 25 мл на 5 гр навески. Показания ионометра переводились в мг/кг сырой массы с помощью калибровочного графика. Пигменты определялись спектрофотометрическим методом в ацетоновых экстрактах (поглощение 662, 644 и 440,5 нм), расчёт концентрации пигментов проведён по уравнениям Хольма-Веттштейна.

Результаты и их обсуждение. Различий в значениях энергии прорастания у контрольных и обработанных образцов обнаружено не было, так как по прошествии 3-х дней этот показатель во всех случаях составили 100%.

Ионометрическое исследование на нитраты показало, что в контроле их содержание достоверно ниже, чем в обработанных препаратами образцах. Наиболее высокое содержание нитратов было обнаружено и варианта с обработкой препаратом «Байкал ЭМ-1». Результаты исследования отображены в таблице (Таблица 1) и на гистограмме (Рисунок 1).

Таблица 1. Содержание нитратов в фасоли золотистой при обработке бактериальными препаратами и без неё, мг/кг сырой массы

Вариант	Содержание нитратов
Контроль	108±3,018
Экобактер терра	151±2,393
Байкал ЭМ-1	191±0,251

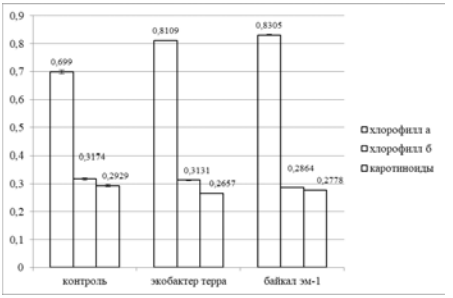


Рисунок 1. Содержание нитратов в фасоли золотистой при обработке бактериальными препаратами, мг/кг сырой массы.

Полученные результаты ионометрического исследования позволяют предположить наличие положительного влияния исследуемых препаратов на накопление азота у растений фасоли золотистой на ранних этапах онтогенеза, что может способствовать более активному росту обработанных растений и их большей продуктивности.

Что касается фотосинтетических пигментов, то большее их количество накопилось у растений, обработанных биопрепаратами. У обработанных растений содержание хлорофилла a достоверно выше по сравнению с контролем. Достоверные различия в содержании хлорофилла b и каротиноидов у контрольных и опытных вариантов малы или вовсе отсутствуют. Наиболее высокое содержание хлорофилла a было обнаружено у варианта с обработкой препаратом «Байкал ЭМ-1». Результаты исследования отображены в таблице (Таблица 2) и на гистограмме (Рисунок 2).

Таблица 2. Содержание пигментов в фасоли золотистой при обработке бактериальными препаратами и без неё, мг/г сырой массы.

	Контроль	Экобактер терра	Байкал ЭМ-1
Хлорофилл a	0,699±0,0064	0,8109±0,0018	0,8305±0,0020
Хлорофилл b	0,3174±0,0038	0,3131±0,0012	0,2864±0,0004
Каротиноиды	0,2929±0,0038	0,2657±0,0012	0,2778±0,0005

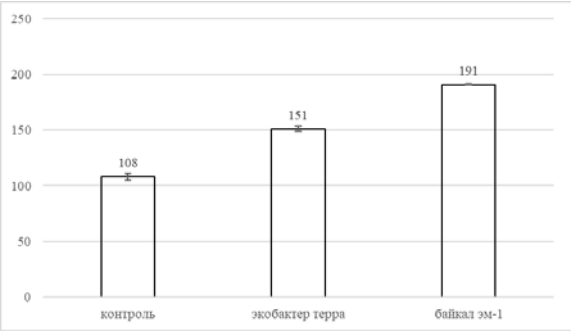


Рисунок 2. Содержание пигментов в фасоли золотистой при обработке бактериальными препаратами и без неё, мг/г сырой массы (столбцы слева направо, соответственно: хлорофилл a, хлорофилл b, каротиноиды).

Более высокое по сравнению с контролем содержание хлорофилла а, являющимся основным пигментом светособирающего комплекса, позволяет сделать предположение об увеличении его площади.

Выводы. Препараты Экобактер терра и Байкал ЭМ-1 усиливали накопление нитратов и увеличивали содержание пигментов у всходов растений фасоли золотистой. Учитывая, что нитраты являются одной из запасных форм азота, а хлорофилла а – основным пигментом фотосистемы, можно сделать предположение, что предпосевная обработка данными препаратами будет способствовать более активному наращиванию вегетативной массы и, как следствие, большей урожайности.

Список литературы

1. Иксанова, М. А. Анализ фенологии, роста и продуктивности фасоли сортов Уфимская и Золотистая при инокуляции эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* в условиях Предуралья / М. А. Иксанова, С. Р. Гарипова // Доклады Башкирского университета. – 2021. – Т. 6, № 3. – С. 152-157. – DOI 10.33184/dokbsu-2021.3.2. – EDN LPSSBT.

2. Овадыкова, Ж. В. Изучение нетрадиционной зернобобовой культуры золотистая маш в Калмыкии / Ж. В. Овадыкова, С. В. Убушаева // Актуальные проблемы социально-экономического развития Прикаспийского региона в условиях инновационной экономики : Казахстанская Международная научно-практическая конференция, Элиста, 17–19 мая 2012 года. Том Часть 1. – Элиста: Калмыцкий государственный университет, 2012. – С. 219-220. – EDN UBCFNX.

3. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. М., 1986. – С. 36-63.

НОВЫЕ БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ МУЛЬТИКОНВЕРТИРОВАННЫХ СУБСТРАТОВ

Титова Ю.А.
Институт леса им. В. Н. Сукачева, Красноярск

Разработка технологии получения биопрепаратов состоит из ряда этапов, первым и наиболее важным из которых является подбор и оптимизация питательных субстратов [1]. Они должны содержать дешевые и доступные источники питания и необходимый набор микроэлементов для быстрого роста и развития штаммов-продуцентов. При этом компонентный состав субстрата не должен отрицательно влиять на их биологическую активность и обеспечивать полифункциональность [2–4]. Таким требованиям полностью отвечают отработанные отходы съедобного грибоводства – самые дешевые, богатые питательными компонентами и доступные субстраты для культивирования штаммов-продуцентов полифункциональных биопрепаратов [5, 6].

Цель исследования – разработать методологию получения жидкофазных полифункциональных биопрепаратов для защиты растений на основе производственных штаммов микроорганизмов путем использования мультиконвертированных съедобными макромицетами растительных отходов техногенной сферы и сельского хозяйства. Для достижения поставленной цели решали задачи получения водных экстрактов из различных отходов (SMS – spent mushroom substrate) производства съедобных искусственно культивируемых грибов – ксилотрофов – *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 4080 (шиитаке), *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. НК-35 (вешенки), а также последовательной би- (шиитаке и вешенки) и трикультуры (шиитаке, вешенки и шампиньона – *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach X-22), разработки на их основе полусинтетических питательных сред для жидкофазной ферментации штаммов-продуцентов из *Prokaryota* и *Eucaryota*, наработки и оценки качества опытных партий лабораторных образцов принципиально новых мультиконверсионных биопрепаратов, оптимизации условий их хранения, выявление динамики титров штаммов-продуцентов при хранении.

Работу проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР с использованием чистых культур штаммов-продуцентов полифункциональных биопрепаратов, депонированных в Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей ФГБНУ ВИЗР. Коллекция зарегистрирована

28.01.1998 № 760 в World Federation for Culture Collections, World Data Centre for Microorganisms (WFCC WDCM, Japan). Материалами исследований были отходы полупромышленного культивирования съедобных ксилотрофов (SMSLe, SMSPo). Кроме того, материалами служили мультиконверсионные субстраты – отходы би- и трикультуры макромицетов (SMSLePo, SMSLePoAb). Для би- и трикультуры съедобных макромицетов использовали коммерческий мицелий Sylvan, Inc. Использованные для мультибиоконверсии субстраты в интактном и отработанном состояниях имели следующий состав (на вес субстрата 70 %-й влажности), SMSPo: ферментированные лузга гречихи и подсолнечника (1:1), опилки смешанные – 7 %, CaCO3 – 0.1 %, CaSO4 2H2O – 1 %; SMSLe: ферментированные опилки дубовые, отруби пшеничные – 10 %, CaCO3 – 0.1 %, CaSO4 2H2O – 1 %, содержащие грибной белок в виде мицелия *P. ostreatus* HK-35 и *L. edodes* 4080 соответственно; SMSLePo: ферментированный SMSLe, содержащий грибной белок в виде мицелиев шиитаке и вешенки; SMSLePoAb: ферментированный SMSLePo, содержащий грибной белок в виде мицелиев шиитаке, вешенки и шампиньона. Для получения и хранения чистых культур съедобных грибов и штаммов-продуцентов, а также наработки лабораторных образцов мультиконверсионных жидких биопрепаратов использовали питательные среды на основе водных экстрактов SMSLe, SMSPo, SMSLePo и SMSLePoAb. Субстрат предварительно измельчали и кипятили в течение 1 часа в объеме 200 г/л, фильтровали, восстанавливали до исходного объема. Режим паровой стерилизации – 30 мин. при 0.5–0.8 атм в автоклаве 5075ELVPV D (Tuttnauer Europe B.V., Нидерланды) [7].

Объектами исследований были промышленные штаммы-продуценты полифункциональных биопрепаратов различного спектра действия: *Bacillus subtilis* (Ehren.) Cohn B-10, M-22, И-5 12/23; *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. et Nirenberg T-32, T-36, T-37, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 10K-4, *B. pseudobassiana* S.A. Rehner et R.A. Humber BCu22; *Brachycladium papaveris* (Sawada) Shoemaker et Inderb. 1.39, 1.39-8; *Fusarium culmorum* var. *culmorum* (W.G. Sm.) *Sacc.* K-4, K-4-7.

Жидкофазный инокулюм штаммов-продуцентов из числа микромицетов как и экспериментальные образцы полифункциональных биопрепаратов получали культивированием в водных экстрактах различных SMS при 24–26° C в течение 5 сут с аэрацией (250 об/мин, шейкер-инкубатор New Brunswick™ Innova® 44, Eppendorf, Германия). Жидкофазный инокулюм бактериальных штаммов-продуцентов выращивали при 27–28° C в течение 3 сут с аэрацией (150 об/мин). В работе использовали следующие общепринятые методы

исследований: культивирования и создания инокулюма, определения споропродуктивности (титра), оценки качества лабораторных образцов биопрепаратов [7]. Количество и качество жизнеспособных колониеобразующих единиц штаммов-продуцентов (КОЕ/мл) полученных инокулюмов (титры), споропродуктивность штаммов-продуцентов и качество опытных партий различных экспериментальных образцов полифункциональных биопрепаратов определяли методом серийных разведений с высевом на агаризованные среды: Czapek-Dox agar (HiMedia Laboratories, India); peptonic Czapek's and Dried nutrient agar (Microgen Co. Ltd., Russia). Повторность 5-кратная. Жидкофазную ферментацию бактериальных штаммов-продуцентов в контроле проводили на жидкой среде для промышленного культивирования, содержащей мелассу – 15 г/л, кукурузный экстракт – 30 г/л, pH=7.8; из числа микромицетов – на жидкой среде Czapek (HiMedia Laboratories, India). Качество опытных партий лабораторных образцов жидких мультиконверсионных биопрепаратов оценивали по титрам, а также степени контаминации их образцов визуально (по культуральным признакам) и с помощью стандартного метода последовательных серийных разведений. Состав использованных в работе экстрактов из мультиконвертированных субстратов охарактеризовали по содержанию общего азота и сырого протеина в Испытательной лаборатории Федерального государственного бюджетного научного учреждения Агрофизического научно-исследовательского института (ФГБНУ АФИ, Россия, г. Санкт-Петербург) в соответствии с ГОСТ РФ 51417-99 (ISO 5983-97).

Получены водные экстракты из растительных отходов техногенной сферы и сельского хозяйства после их последовательной переработки культивируемыми съедобными макромицетами, для жидкофазной ферментации штаммами-продуцентами полифункциональных биопрепаратов. В водных экстрактах отходов моно-, би- и трикультуры съедобных макромицетов определили содержание общего азота и сырого протеина соответственно: SMSLe – 0.94, 5.87; SMSPo – 0.84, 5.25; SMSLePo – 1.51, 9.44; SMSLePoAb – 1.22, 7.62 % от веса жидкого субстрата.

На вышеописанных жидких субстратах были наработаны и стандартизованы по титрам опытные партии лабораторных образцов полифукциональных биопрепаратов. Титры опытных образцов (КОЕ/мл) на основе *T. asperellum*: SMSPoT-32 – 3.3 1010, SMSLeT-32 – 2.1 1010, SMSLePoT-32 – 2.2 1010, SMSLePoAbT-32 – 2.2 1010; SMSPoT-36 – 3.1 1010, SMSLeT-36– 2.7 1010, SMSLePoT-36– 2.5 1010, SMSLePoAbT-36 – 1.4 1012; SMSPoT-37 – 3.2 1010, SMSLeT-37 – 3.7 1010, SMSLePoT-37 – 8.9 1011, SMSLePoAbT-37 – 2.3 1012; *B. bassiana*: SMSPo10K-4 – 1.1 109, SMSLe10K-4 –

4.2 108, SMSLePo10K-4 – 9.5 108, SMSLePoAb10K-4 – 9.1 108; *B. pseudobassiana*: SMSPoBCu22 – 2.3 109, SMSLeBCu22 – 2.9 109, SMSLePoBCu22 – 6.1 108, SMSLePoAbBCu22 – 1.1 109; *B. papaveris*: SMSPo1.39 – 1.8 107, SMSLe1.39 – 1.9 106, SMSLePo1.39 – 1.2 107; SMSPo1.39-8 – 1.1 108, SMSLe1.39-8 – 1.4 106, SMSLePo1.39-8 – 2.9 107; *F. culmorum*: SMSPoK-4 – 2.3 109, SMSLeK-4 – 2.9 109, SMSLePoK-4 – 6.1 108; SMSPoK-4-7 – 1.1 109, SMSLeK-4-7 – 4.2 108, SMSLePoK-4-7 – 1.1 109; *B. subtilis*: SMSPoB-10 – 6.5 1011, SMSLeB-10 – 5.2 1011, SMSLePoB-10 – 3.2 1012; SMSPoM-22– 5.1 1012, SMSLeM-22– 1.5 1012, SMSLePoM-22– 1.2 1012; SMSPo5И 12/23 – 8.1 1011, SMSLe5И 12/23 – 2.1 1011, SMSLePo5И 12/23 – 1.8 1012, SMSLePoAb5И 12/23 – 1.3 1012.

Оптимизированы условия хранения лабораторных образцов жидкофазных мультиконверсионных полифункциональных биопрепаратов: без потери титров и сохранением целевой биологической активности экспериментальные образцы могут храниться в течение 3-х месяцев при 4–6° С в условиях холодильной камеры. При более длительном хранении (4–6-и месяцев) титры сокращаются на порядок.

Фиторегуляторную активность и биологическую эффективность опытных партий экспериментальных образцов мультиконверсионных жидкофазных полифункциональных биопрепаратов оценивали в вегетационных, мелкоделяночных и производственных полевых условиях.

Таким образом, разработана методология получения экспериментальных образцов жидкофазных мультиконверсионных полифункциональных биопрепаратов различного спектра действия, наработаны опытные партии с титрами, не уступающими зарегистрированным аналогам [8]. Оптимизированы условия хранения в течение 3-х месяцев при 4–6° С без потери титров и сохранением целевой биологической активности экспериментальных образцов.

Список литературы

1. Pavlyusin VA, Novikova II, Boikova IV (2020) Microbiological control in phytosanitary optimization technologies for agroecosystems: research and practice (review). Agric. Biol. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.3.421eng.

2. Новикова И. И. Полифункциональные биопрепараты в современных системах фитосанитарной стабилизации агроценозов. В сб.: Современные средства и технологии защиты основных сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорной растительности. СПб, 2010: 49–50.

3. Anwer MDA (2017) Status of biopesticides and biocontrol agents in

agriculture: an overview. In: Anwer, M.D.A. (ed.). Biopesticides and Bioagents: Novel Tools for Pest Management, pp.12–26. Apple Academic Press Inc. https://doi.org/10.1201/9781315365558

4. Джалилов ФС (2018) Биологические препараты против болезней растений. Картофель и овощи. 8:2–4. https://doi.org/10.25630/PAV.2018.8.18269

5. Othman NZ, Sarjuni MNH, Rosli MA, Nadri MH, Yeng LH, Ying OP, Sarmidi MR (2020) Spent mushroom substrate as biofertilizer for agriculture application. In: Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume I: Biological Approaches. Applied Environmental Science and Engineering for Sustainable Future. Eds.: Zakaria ZA, Boopathy R, Dib JR. Springer, 37–58. https://doi.org/10.1007/978-3-030-39137-9

6. Titova JA (2021) Spent mushroom substrates valorization via brand new multirecycled polyfunctional biologics producing on them. Waste Biomass Valor. 13(6):1089–1100. https://doi.org/10.1007/s12649-021-01552-5

7. Методы экспериментальной микологии: Справочник. Киев: Наук. думка, 1982. 550 с.

8. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть I. Пестициды. М.: Минсельхоз, 2023. 921 с.

ДИНАМИКА И МЕХАНИЗМЫ КОЛОНИЗАЦИИ КОЛОСЬЕВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРОМИЦЕТАМИ

Торопова Е.Ю.[1,2], Селюк М.П.[1,2], Воробьева И.Г.[2,3]

[1]Новосибирский государственный аграрный университет

[2]ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы

[3]Новосибирский государственный педагогический университет,

Почвенные фитопатогенные микромицеты в процессе эволюции адаптировались к реализации основной экологической ниши в подземных органах растений, а дополнительной – в надземных вегетативных и генеративных органах [1]. На сортах яровой пшеницы в Западной Сибири широкое распространение имеют паразитарные системы с участием Helminthosporium *sativum Sacc.* и грибов из рода *Fusarium* Link. [2,3]. Указанные микромицеты широко распространены по всему миру и системно инфицируют растения, *H. sativum* – более 60 видов мятликовых, а грибы рода *Fusarium* – более 200 видов разных семейств [4-6]. Заселяя почвы умеренных зон всего Мира, микромицеты инфицируют подземные органы растений-хозяев, где они осуществляют трофические функции и

размножаются. Генеративные органы растений они колонизируют при благоприятных гидротермических условиях, вызывая у зерновых культур фузариоз и гельминтоспориоз колоса и микотоксикоз зерна [6-8]. Заражение колоса может происходить по сосудам растений-хозяев или воздушно-капельным путем, однако механизмы и сроки колонизации колоса пшеницы наиболее опасными видами почвенных фитопатогенов изучены недостаточно, хотя это имеет решающее значение для понимания закономерностей формирования патогенных микоценозов колоса и разработки эффективных агротехнологий, предотвращающих развитие фузариоза и гельминтоспориоза колоса и микотоксикоза зерна.

Исследования проводили в 2021-2022 годах в северной лесостепи Приобья (Западная Сибирь) на коллекции из 11 сортов яровой пшеницы ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН. по общепринятым методикам [9]. Сорта имели разное географическое происхождение: Сибирь (Сибирская 17), Урал (Зауралочка), Европейская часть России (LT-3), Китай (Jin Chun 2), Таджикистан (К-65834), Германия (Remus), Швейцария (Quarna), Финляндия (Manu), Канада (NIL Thatcher Lr13), Австралия (Calingiri), ЮАР (Karee). Площадь под каждым сортом 3 м2 в трехкратной повторности. В июле на фазе выход в трубку - начало стеблевания (VII этап) были установлены изоляторы на колосья всех сортов. На каждом сорте были изолированы по 90 колосьев (30 на каждой повторности)В июне, июле и августе были отобраны колосья по 5 фазам развития яровой пшеницы: начало выхода в трубку (IV этап органогенеза), выход в трубку - начало стеблевания (VII этап), цветение (IX этап), налив зерна, молочная спелость (XI этап), полная спелость (XII этап). С каждого сорта на фазах начало выхода в трубку (IV этап органогенеза) и выход в трубку - начало стеблевания (VII этап) были отобраны по 30 колосьев (по 10 с каждой повторности). На фазах цветение (IX этап), налив зерна, молочная спелость (XI этап), полная спелость (XII этап) с каждого сорта яровой пшеницы были отобраны по 60 колосьев: 30 изолированных и 30 интактных (10 изолированных и 10 интактных с каждого повторения). Микологический анализ колосьев был проведен на агаре Чапека (ЧА) в 5 кратной повторности. На каждую чашку были помещены по 10 простерилизованных фрагментов органов колоса (колосовой стержень, зачатки зерна или зерновки). На 10 сутки инкубации был проведен анализ колоний грибов с прижизненным определением видовой принадлежности часто встречающихся и хорошо известных видов. Менее известные или не имеющие четкого спороношения грибы были выделены в чистую культуру на КСА (картофельно-сахарозный агар), подвергнуты

температурной стимуляции спороношения и идентифицированы до вида по определителям. Результаты учетов представлены в таблице.

Данные таблицы 1 свидетельствуют о ранней колонизации колосьев почвенными фитопатогенами. Из стержней зачатков колосьев сортов Jin Chun 2 и Karee уже на IV этапе органогенеза были выделены *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides*, что указывает на их способность к продвижению по сосудам растений и раннему заражению колосьев. На фазе начало выхода в трубку (VII этап органогенеза) эти фитопатогены были выделены из стержней колосьев уже 7 сортов и из зачатков зерен трех сортов. Следует отметить, что *H. sativum* был также выделен из стержней колосьев сорта Зауралочка из Курганской области и канадского сорта Nill Thatcer Lr-35 до выхода колосьев из трубки (IV-VII этапы органогенеза), что также может свидетельствовать о способности этого микромицета к росту по сосудам растений яровой пшеницы, чего ранее не отмечали в литературе. Массовая колонизация колосьев началась в фазу молочной спелости зерна, причем стержень колоса был инфицирован фитопатогенами сильнее зерновых зачатков как на изолированных, так и на интактных колосьях. На фазе цветения разница в инфицировании стержней и зерен составляла у *H. sativum* 24.8 раз, у грибов рода *Fusarium* – 2,4 раза, у грибов рода *Alternaria* – 19,4 раза. Изоляторы полностью ограничивали колонизацию колосьев альтернариевыми грибами до фазы молочной спелости. Затем началась активная реализация экологических ниш всеми микромицетами и к концу вегетации свободные ниши остались только в изолированных колосьях, интактные были колонизированы микромицетами на 100%. Было выявлено доминирование *H. sativum* как на стержнях колосьев, так и на зерновках, вторую позицию на стержнях занимали грибы рода *Fusarium*, а на зерновках – грибы рода *Alternaria*. В целом следует отметить, что динамика колонизации изолированных и интактных колосьев показала более раннее заселение микромицетами стержней, по сравнению с зерновками, явную приуроченность *H. sativum* и грибов рода *Fusarium* к стержням колосьев и тенденцию к снижению инфицирования зерновок грибами рода *Fusarium* к фазе полной спелости по сравнению с предыдущей фазой молочной спелости.

Таблица 1. Микоценоз органов колосьев 11 сортов яровой пшеницы по фазам развития, %.

Вариант	*Bipolaris sorokiniana*	*Fusarium spp.*	*Alternaria spp.*
Выход в трубку (IV этап органогенеза)			
Стержень колоса	0,3	0,8	0
Цветок	0	0	0
Начало стеблевания (VII этап)			
Стержень колоса	0,9	1,9	0
Цветок	0	1,2	0
Цветение (IX этап)			
Стержень колоса - изолятор	4,2	3,4	0
Зачаток зерна - изолятор	0	2,1	0
Стержень колоса - интактный	14,9	18,8	23,3
Зачаток зерна - интактный	0,6	7,9	1,2
Молочная спелость (XI этап)			
Стержень колоса - изолятор	13,3	17,9	5,2
Зачаток зерна - изолятор	6,6	9,4	3,0
Стержень колоса - интактный	23,9	23,9	21,8
Зерно - интактное	10,3	17,0	9,1
Полная спелость (XII этап)			
Стержень колоса - изолятор	30,0	20,0	10,6
Зачаток зерна - изолятор	18,2	15,8	7,4
Стержень колоса - интактный	48,8	30,2	21,0
Зерно - интактное	43,3	11,5	25,2

Благодарность: работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-26-00066.

Список литературы

1. Vorobyeva I. G., and Toropova E. Yu. On the Issue of Ecological Niches of Plant Pathogens in Western Siberia // Contemporary Problems of Ecology. 2019. Vol. 12. No. 6. pp. 667–674. Pleiades Publishing, Ltd., 2019. DOI: 10.1134/S1995425519060155

2. Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Воробьева И.Г. и соавт. Фузариозные корневые гнили зерновых культур в Западной Сибири и Зауралье // Защита и карантин растений. №9. 2013. С.23-26.

3. Toropova E. Yu., Vorob'ova I. G., Kirichenko A. A., et al. Parasitic activity of plant pathogens at the underground organs of spring wheat in the West Siberia // J. Phys.: Conf. Ser. 1942 0120791942 (2021) 012079 IOP Publishing. doi:10.1088/1742-6596/1942/1/012079.

4. Dixon G. R., Tilston E. L. Soil-Borne Pathogens and Their Interactions with the Soil Environment // Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. 2010. P. 197-271.

5. Toropova E. Yu., Glinushkin A. P., Insebaeva M. K. et al. The conidia *Bipolaris sorokiniana Sacc.* Shoem. distribution in the soil of Altai and Kazakhstan arid regions // J. Phys.: Conf. Ser. 1942 (2021) 012078. 5p. IOP Publishing. doi:10.1088/1742-6596/1942/1/012078.

6. Bernhoft A., Torp M., Clasen P.-E., Loes A.-K., Kristoffersen A.B. Influence of agronomic and climatic factors on *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway // Food Additives & Contaminants, 2012. Part A. P. 1-12.

7. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Левитин М.М. Биоразнообразие и ареалы основных токсинопродуцирующих грибов рода *Fusarium* // Биосфера. 2014. Т. 6. № 1. С. 36-45.

8. Magan N., Medina A., Aldred D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre and postharvest. Plant Pathol. 2011; 60(1):150-63.

9. Чулкина В.А., Торопова Е.Ю., Стецов Г.Я. и соавт. Фитосанитарная диагностика агроэкосистем / под ред. Е.Ю. Тороповой. Барнаул. 2017. 210 с.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩЕЙ И АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭНДОФИТНОЙ БАКТЕРИИ *BACILLUS TOYONENSIS* HG22

Туама А.А.[1,2], Сабирова З.Р.[1], Карамова Н.С.[1], Сташевски З.[3]
[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет
[2] Университет Диялы, Бакуба, Ирак
[3] ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

В природе микроорганизмы и растения тесно связаны между собой различными формами взаимоотношений. Микроорганизмы, заселяющие внутренние ткани растений, при этом не оказывающие негативного воздействия на рост и развитие своих хозяев, называются эндофитными (Hardoim et al., 2015). Эндофиты используют эндосферу растений, как наиболее благоприятную экологическую нишу, которая защищает их от неблагоприятного воздействия внешней среды. Каждое растение содержит в себе более десятка видов эндофитных микроорганизмов. Вероятно, что растения сами проводят отбор микроорганизмов, как наиболее совместимых, и способных снабжать их необходимыми веществами, а также защищать от различных негативных биотических и абиотических факторов. Эндофитные микроорганизмы способны уменьшить или предотвратить вредное воздействие патогенных организмов. Показано, что болезни грибкового, бактериального, вирусного происхождения, а в некоторых случаях даже повреждения, вызванные насекомыми и нематодами, могут быть устранены после инокуляции растений эндофитами (Fadiji, Babalola, 2020). Ранее, в наших исследованиях было показано, что эндофитные бактерии р. *Bacillus*, выделенные из

корней растений картофеля сорта Регги, обладают существенным фунгистатическим потенциалом и подавляют рост грибов *Rhizoctonia solani* и *Colletotrichum coccodes*, возбудителей опасных болезней картофеля (Туама с соавт., 2022). Ростстимулирующие свойства эндофитных микроорганизмов связывают с их способностью продуцировать фитогормоны, сидерофоры, а также улучшать фосфорное и азотное питание растений (Srivastava et al., 2021).

Целью данного исследования явилась оценка фосфатмобилизующего и азотфиксирующего потенциала эндофитной бактерии *Bacillus toyonensis* HG22.

Материалы и методы

Эндофитные бактерии были выделены из корней растений картофеля сорта Регги. Идентификацию изолятов осуществляли методом масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper, Bruker Daltonik, Германия).

Способность бактерий к мобилизации фосфата определяли на среде Пиковской, имеющей в своем составе нерастворимый фосфат кальция (Ca3PO4) в качестве единственного источника фосфора. Культуру бактерий высевали в виде прямой линии на поверхность питательной среды. Посевы инкубировали в термостате при 30°C в течение 10-15 дней. Фосфатмобилизующую активность бактерий оценивали по наличию зоны просветления вокруг колонии бактерий, образующейся из-за разложения нерастворимого фосфата в среде. Фитазную активность бактерий определяли на агаризованной среде Phytase Screening Medium (PSM) по наличию зон просветления вокруг бактериальных колоний, образующихся из-за использования фитата Са бактериями. Способность к фиксации атмосферного азота бактериями была исследована с использованием среды Берка, не содержащей источников азота. Для контроля использовали среду Берка с добавлением (NH4)2SO4. В Чашки Петри с агаризованной средой Берка высевали культуру микроорганизмов и культивировали при 30°C 5-7 дней. Также исследовали динамику роста бактерий в жидкой среде Берка. В колбы с жидкой средой Берка без источников азота и с добавлением 0.1% (NH4)2SO4 (контроль) вносили инокулят. Культуры инкубировали на качалке (200 об/мин) при 30°C в течение 6 суток. Каждые 24 ч. измеряли оптическую плотность суспензии при длине волны 590 нм.

Результаты исследования

Эндофитный изолят, выделенный из корней растений картофеля сорта Регги, на основе результатов MALDI-TOF масс-спектрометричекого анализа был идентифицирован как *Bacillus toyonensis* HG22.

При исследовании фосфатмобилизующей активности эндофитного

изолята *Bacillus toyonensis* HG22 установлено, что он может расти на среде PSM, где источником фосфора является C6H6Ca6O24P6. Использование данного соединения бактериями подтверждается наличием четких зон просветления в питательной среде вокруг колоний за счет расщепления фитата. Другим источником фосфора для живых организмов могут быть фосфаты – FePO4, Na3PO4, Ca3(PO4)2, однако низкая растворимость ограничивает их доступность для растений. Известно, что многие микроорганизмы могут расщеплять нерастворимые фосфаты за счет синтеза органических кислот (Teng et al., 2020). Посев исследуемого эндофитного изолята на питательную среду Пиковской, содержащей Ca3(P04)2, позволил установить, что данные бактерии способны усваивать Ca3(P04)2 и расти на данной среде. При этом вокруг их колоний наблюдались прозрачные зоны за счет фосфатмобилизующей активности.

Скрининг активности на плотной питательной среде Берка показал, что эндофитный изолят способен расти на данной среде, причем интенсивность роста была примерно такой же, как и на среде Берка с добавлением (NH4)2SO4. Далее мы исследовали динамику роста изолята эндофитных бактерий в жидкой среде Берка в течение 6 суток. Как на среде с сульфатом аммония, так и в среде Берка без источников азота происходит постепенное увеличение биомассы эндофитного изолята, что свидетельствует о его азотфиксирующем потенциале и способности поддерживать жизнедеятельность в отсутствии связанных форм азота.

Таким образом, полученные результаты показывают, что эндофитный изолят *Bacillus toyonensis* HG22, наряду с фунгистатическим действием, способен улучшать питание растений за счет повышения доступности жизненно важных элементов.

Список литературы

1. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2015. – V. 9, No. 3. – P. 293–320.

2. Fadiji AE, Babalola OO. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – V. 8. – P. 1–20.

3. Туама А.А. Фунгистатическое действие эндофитных бактерий картофеля в отношении фитопатогенных грибов / Туама А.А., Карамова Н.С., Сабирова З.Р., Сташевски З. // Современная микология в России. Материалы 5 Съезда микологов России. – 2022. – Том 9, Вып. 3. Взаимоотношения грибов, бактерий и растений. Микориза. – С. 225–226.

4. Srivastava A.K., l Kashyap L.P., Santoyo G., Newcombe G. Editorial:

plant microbiome: interactions, mechanisms of action, and applications // Frontiers in Microbiology. – 2021. – V. 12. – P. 1–3.

5. Teng, Z. Zhu J., Shao W., Zhang K., Li M., Whelan M. J. Increasing plant availability of legacy phosphorus in calcareous soils using some phosphorus activators // J. Environ Manage. – 2020. V. 256. – P. 100–121.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

А
Абдулахадова Г.Ш. — 250
Абдульмянова Л.И. — 206, 253
Авакумов А.Д. — 440
Адамян Р.Г. — 318
Азимова Н.Ш. — 19
Аккузина С.Г. — 168
Александрова А.В. — 76, 158, 285
Алехова Т.А. — 76, 158
Алиев И.А. — 4
Алмухтар О.А.Х. — 170
Ананьева Е.П. — 63, 267
Андреева И.С. — 320
Аникина Н.А. — 50
Анискина А.А. — 436
Антипова Т.В. — 258
Арашкова А.А. — 382
Арзуманян В.Г. — 387
Асфха З.А. — 371
Ахмедова З. Р. — 138

Б
Бадалян С.М. — 171
Баймаханова Б.Б. — 326
Баймаханова Г.Б. — 326
Балгимбаева А.С. — 326
Барабошкина А.В. — 333
Барокова Е.Б. — 350
Басалаева Д.Л. — 179, 261
Баскунов Б.П. — 258
Баталова И.Р. — 189
Башаров А.А. — 158
Бекмухамедова Н.К. — 44, 174
Белахов В.В. — 329
Белая Т.Д. — 148
Белов Ю.А. — 385
Белоусова З.П. — 333
Блинкова Л.П. — 298
Блинова Е.О. — 50
Богачева А.В. — 79
Богданов И.В. — 184
Богданова О.Ю. — 7
Богомолова А.А. — 179, 261
Богомолова Е.В. — 341
Богуш М. А. — 180
Бокарева Д.А. — 263
Ботирова И.С. — 174
Бочкарева Ю.В. — 79
Булимага В.П. — 87
Буриева М.Р. — 253
Бухарина И.Л. — 82
Бынина М.П. — 385, 396
Бычкова О.П. — 368

В
Ванцян М.А. — 263
Васильченко В. В. — 143
Велькер Д.А. — 14
Ветчинкина Е.П. — 303
Волкова В.Д. — 91
Волчек И. А. — 376
Воробьева И.Г. — 448
Воропаев А.Д. — 184
Вощиков В.И. — 341

Г
Гагкаева Т.Ю. — 54
Газиев Г.М. — 395
Гарибян Н.Г. — 171
Гасанова В.Я. — 417
Георгиева М.Л. — 236
Гигиняк Ю.Г. — 97
Глинушкин А.П. —431
Глотов А.Г. — 14
Глотова Т.И. — 14, 37
Глухова А.А. — 336
Гоглова А.В. — 333
Голубев В.И. — 188
Голубева Т.С. — 390

Гончарова И.А. — 97
Горбацевич Г.И. — 189
Горшков В.Ю. — 303
Грамматикова Н.Э. — 213
Грибуст И.Р. — 372
Гулямова Т.Г. — 206, 253
Гурина С.В. — 63, 267

Д
Дворнина Е.Г. — 87, 272
Демидов В.Н. — 341
Демьянкова М.В. — 336
Джабир М.С. — 170
Джалилова А.Н. — 395
Джалилова Д.Н. — 395
Долгачева Ю.А. — 258
Домрачева Л.И. — 59
Дудченко Г.Н. — 414
Дудченко И.П. — 414

Е
Евсеева Н.В. — 242
Еланский С. Н. — 101
Елшин И.А. — 277
Ефименко Т.А. — 336
Ефимова Л.Н. — 341
Ефимочкина Н.Р. — 135
Ефременкова О.В. — 336

Ж
Жаркова О.А. — 346
Жгун А.А. — 311
Желифонова В.П. — 258
Желтикова Т.М. — 409
Жилина К.В. — 30
Жуковская Л.А. — 314
Жураева Р.Н. — 162

З
Загустина Н.А. — 76, 158
Зайковская А.В. — 196
Зайнитдинова Л.И. — 162, 174
Закарян Н.А. — 318
Зейналова Л.А. — 310
Зеневич Л.С. — 189
Зорькина О.В. — 372

И
Иванкова Т.Д. — 368
Иванов А.А. — 390
Иванова А.В. — 196
Иванова А.Г. — 341
Игнатов А.Н. — 359
Иксанова А.М. — 387
Исламова Н.А. — 82
Исупова А.А. — 82
Ишков Ю.Н. — 346

К
Кабанов А.С. — 191
Кабаргин Л.А. — 295
Кабаргина М.В. — 295
Казачинская Е.И. — 196
Камилов Ш.Г. — 420, 424
Карамова Н.С. — 452
Каримов Х.Х. — 19
Керимова Л.А. — 310
Киселева М.И. — 431
Клапко С.Ф. — 272
Кленова Н.А. — 333
Коваленко С.А. — 189
Козырева А. М. — 101
Кокаева Л. Ю. — 101
Колодязная В.А. — 329
Коломиец Т.М. — 431
Колосова И.В. — 227
Колотова О.В. — 372

Колыганова Т.И. — 387
Кондрук В.Ф. — 272
Коротких А.И. — 59
Котенева С.В. — 14
Кощеева С.С. — 168
Краснопольская Л.М. — 217
Кручеан Ш.М. — 127
Крылова И.Н. — 170
Кряжев Д.В. — 104
Куварина А.Е. — 236
Кузиева Н.Х. — 206
Кузнецова А.А. — 333, 414
Куйгенова Ф.Х. — 350
Кукина Т.П. — 277
Кулаков М.Я. — 403
Кулешова К. И. — 281
Куликов С.Н. — 351
Кураков А.В. — 236
Кутырева М.П. — 355
Кухар Е.В. — 37

Л
Лаблюк С.В. — 87, 272
Лавренова В.Н. — 211
Лазутин Н.А. — 162
Левшин И.Б. — 213
Летвинова В.С. — 382
Литовка Ю.А. — 258
Лиховидов В.Е. — 285
Лияськина А.Ю. — 291
Лияськина Е.В. — 291
Лунгу А.А. — 127
Лысакова В.С. — 217
Лянгузова И.В. — 109
Ляпун И.Н. — 396

М
Мавжудова А.М. — 162
Маврина А.С. — 291
Мазуркова Н.А. — 231
Майорова И.В. — 67
Макаревич Е.В. — 231
Максимова В.Ю. — 63, 267
Мамиев М.С. — 44, 174
Мануйлов С.И. — 133
Маркарян Л.В. — 112
Маркелова Н.Н. — 368
Матевосян Р.Э. — 112
Матосова Е.В. — 385, 396
Матрой А.А. — 87
Миралимова Ш.М. — 19
Мичурина А. П. — 376
Мокроносова М.А. — 409
Момбекова Г.А. — 326
Мысякина И.С. — 263

Н
Назарова Я.И. — 238
Нанагюлян С.Г. — 112, 318
Нарыкина А.И. — 333
Насибов Э.М. — 219
Непомнящих Т.С. — 191, 227
Нефедченко А.В. — 14
Нефедьева Е.Э. — 372
Никитина З.К. — 219
Никонова А.А. — 9
Новицкая И.В. — 403
Нугманова Т.А. — 295
Нураева Г.К. — 311

О
Обернихина Н.И. — 376
Овчинников Р.С. — 25
Овчинникова А.С. — 191
Овчинникова Т.В. — 184
Оганесян Л.В. — 189
Одношевский Д.А. — 191
Ожован И.М. — 387
Осмоловский А. А. — 179, 211, 261

П
Павлов И.Н. — 258
Панов А.А. — 213
Панчук С.В. — 359
Пахолкова Е.В. — 431
Пахомов Ю.Д. — 298
Пахомова Т.Б. — 341
Петрова А.П. — 346
Петрова И.В. — 30
Петровская И.Ф. —148, 191, 227
Петросян А.М. — 112
Плотников А.Д. — 158
Погосян А.В. — 318
Подзорова М.В. — 153
Подпорин М.С. — 365
Позднякова Н.Н. — 120
Полищук И.С. — 400
Польшаков В.И. — 213
Поляк Ю.М. — 116
Полякова Г.Г. — 436
Попова Е. А. — 281
Постникова О.Н. — 362
Просычева О.О. — 365
Проценко М.А. — 231
Псурцева Н.В. — 63, 67, 267
Пудова О.Б. — 346
Пушкарь В.Г. — 403
Пчелкин А.В. — 223
Пьянков О.В. — 191, 196

Р
Ребрикова Н.Л. — 125
Ребус М.Е. — 320
Ревин В.В. — 291
Рогожин Е.А. — 217
Романовский А. С. — 371
Россова А.А. — 355
Рошка Ю.А. — 236
Рябинина Л.А. — 403

С
Сабирова З.Р. — 452
Савинов В.А. — 25
Садыкова В.С. — 236, 336, 368
Сайнчук А.Д. — 67
Самойликов П.В. — 387
Самылина И.В. — 33
Сейфуллаева Л.Р. — 365
Селюк М.П. — 448
Семашко Т.В. — 314
Семикрасова А.Н. — 30
Сенашова В.А. — 436
Сергеева Ю.Д. — 91
Серова О.А. — 231
Симонов А.Ю. — 213
Синева О.Н. — 217, 368
Смагулова А.М. — 37
Смирнов А. Н. — 143
Смирнов В.Ф. — 50
Смирнов И.А. — 329
Смирнова О. Г. — 143
Смотрина Ю.В. — 135
Соколова Т.Н. — 97
Соляникова И.П. — 371
Сосновская Н.Е. — 97
Спанкулова Г.А. — 326
Ставский Е.А. — 148
Сташевски З.З. — 452
Судоргина Т.И. — 14
Суркова Д.Е. — 211
Сухова Е.А. — 372
Сухоруков А.И. — 440

Т
Татаркина Л.Г. — 326
Теплякова Т.В. — 148, 191, 227, 231
Терехова В.А. — 91
Терешко Д.Л. — 403
Тертышная Ю.В. — 153
Теряев А. С. — 376

Тетерятникова Н.Н. — 403
Титова Ю.А. — 444
Тишкин А.А. — 291
Торопова Е.Ю. — 448
Травкин В.М. — 371
Треножникова Л.П. — 326
Тригубович А.М. — 97
Туама А.А. — 452
Турковская О.В. — 120
Тяпкин А.В. — 390

Ф
Файзулина Э.Р. — 326
Фатеева С.И. — 184
Федосеева Е.В. — 91
Филиппова Е.И. — 231
Финкина Е.И. — 184
Флисюк Е.В. — 7

Х
Хайруллин Р.З. — 351
Халдеева Е.В. — 355
Халмурадов Э.А. — 420, 424
Хамидова Х.М. — 19
Хамраева З.Т. — 138
Ханнанов А.А. — 355
Хараева З.Ф. — 350
Холмуродов У.Э. — 420, 424
Хомутов А.Р. — 311
Хомутов М.А. — 311
Хуснетдинова Т.И. — 336

Ц
Цао Ю. — 180
Царуева Т.В. — 395
Цивилева О.М. — 242
Цублова Е.Г. — 170

Ч
Черных Т.Ф. — 7
Чернышенко В.С. — 63, 267
Чилочи А.А. — 87, 272
Чистяков И.Н. — 258
Чистякова Т.Б. — 329
Чхенкели В.А. — 9
Чхенкели Г.Д. — 9

Ш
Шабалин В.Н. — 407
Шатерников А.Н. — 242
Шатохина И.С. — 407
Шатохина С.Н. — 407
Шахазизян И.В. — 112
Шевелева С.А. — 135
Шевченко О.В. — 184
Шегурова А.Ф. — 133
Шестакова А.А. — 211
Широких А.А. — 238
Широких И.Г. — 238
Шишкин А.Ю. — 50
Шонахунов Т. Э. — 138
Шорохова И.А. — 333
Шулаков В.В. — 365
Шульц А.В. — 7

Щ.
Щелканов М.Ю. — 385, 396
Щербакова Т.И. — 127

Э
Элоян И.М. — 318
Эштрекова Э.А. — 350

Ю
Юскевич В.В. — 285

Я

Яковлев А.А. — 385
Якушев А.В. — 336
Яхяева М.А — 138

Глава 10.
ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКОЛОГИЯ

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИКОБИОТЫ
И МИКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
В ЖИВОТНОВОДСКИХ КОМПЛЕКСАХ
Алиев И.А.....4
ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО
ПРОТИВОГРИБКОВОГО СРЕДСТВА
Черных Т.Ф., Флисюк Е.В., Шульц А.В., Богданова О.Ю. 7
КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ
СОСТАВА ЖИРНЫХ КИСЛОТ
ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «ТРАМЕТИН+»
Чхенкели В.А., Чхенкели Г.Д., Никонова А.А. 9
ПАТОГЕННЫЕ ВИДЫ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ РОЛЬ В
ПАТОЛОГИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
Глотова Т.И., Судоргина Т.И., Котенева С.В., Глотов А.Г., Велькер Д.А.,
Нефедченко А.В. 14
ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ НА
АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПАТОГЕНОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЫБ
Хамидова Х.М., Азимова Н.Ш., Каримов Х.Х., Миралимова Ш.М.....19
ВНЕДРЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ
СРЕДЫ ДТМ-ЭКСПЕРТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ДЕРМАТОФИТОЗОВ В ВЕТЕРИНАРНУЮ
И МЕДИЦИНСКУЮ ПРАКТИКУ
Овчинников Р.С., Савинов В.А. 25
МИКОТИЧЕСКАЯ КОНТАМИНАЦИЯ КОРМОВ
ДЛЯ КУНЬИХ КЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ
Петрова И.В., Семикрасова А.Н., Жилина К.В. 30
ВЫЯВЛЕНИЕ ОППОРТУНИСТИЧЕСКОГО ДРОЖЖЕВОГО ГРИБА
AUREOBASIDIUM PULLULANS У ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ
Самылина И.В. 33
СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКОЗОВ КОЖИ У ДОМАШНИХ
И ДИКИХ ЖИВОТНЫХ В КАЗАХСТАНЕ И ЗАПАДНО-
СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ РОССИИ
Смагулова А.М., Глотова Т.И., Кухар Е.В.....37

Глава 11.
ОБЩИЕ ВОПРОСЫ МИКОЛОГИИ

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA* ПОСЛЕ ДОЛГИХ ЛЕТ ХРАНЕНИЯ
Бекмухамедова Н.К., Мамиев М.С. 44
ВЛИЯНИЕ ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ ОКСИДОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ЭКЗООКСИДОРЕДУКТАЗ *ASPERGILLUS NIGER*
Блинова Е.О., Аникина Н.А, Смирнов В.Ф., Шишкин А.Ю. 50
ЗНАЧИТЕЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КЛАССИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*
Гагкаева Т.Ю. 54
СТАРИННЫЕ ГЕРБАРИИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК МИКОБИОТЫ
Коротких А.И., Домрачева Л.И. 59
КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ ШТАММОВ АГАРИКОМИЦЕТОВ
Максимова В.Ю., Чернышенко В.С., Ананьева Е.П., Гурина С.В., Псурцева Н.В. 63
ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ НА ИХ МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Майорова И.В., Сайнчук А.Д. , Псурцева Н.В. 67

Глава 12.
ЭКОЛОГИЯ ГРИБОВ И ЧЕЛОВЕКА

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ НА РОССИЙСКОМ СЕГМЕНТЕ МКС – РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА
Алехова Т.А., Александрова А.В., Загустина, Н.А. 76
НАЧАЛО ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭНТОМОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ ПОРЯДКА HYPOCREALES НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ
Бочкарева Ю.В., Богачева А.В. 79
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОНСОРЦИУМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ВОССТАНОВЛЕНИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ЗЕМЕЛЬ
Бухарина И.Л., Исламова Н.А., Исупова А.А. 82

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТАЛЛОВ НА НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ ГРИБА *LENTINUS EDODES* CNMN FB 01 В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
Дворнина Е.Г., Чилочи А.А., Булимага В.П., Лаблюк С.В., Матрой А.А. 87
ПРОЯВЛЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ СРЕДЫ
Федосеева Е.В., Сергеева Ю.Д., Волкова В.Д., Терехова В.А....91
СОРБЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ АНТАРКТИЧЕСКИМИ МИКРОМИЦЕТАМИ, КОЛОНИЗИРУЮЩИМИ ГОФРОКАРТОН
Гончарова И.А., Тригубович А.М., Гигиняк Ю.Г., Соколова Т.Н., Сосновская Н.Е. 97
МИКРОБИОТА СМАЗОЧНО-ОХЛАЖДАЮЩИХ ЖИДКОСТЕЙ
Козырева А. М., Еланский С. Н., Кокаева Л. Ю....101
МИКОЭКОЛОГИЯ НЕПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ ГОРОДА НИЖНЕГО НОВГОРОДА
Кряжев Д.В. 104
ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПЛОДОВЫХ ТЕЛ МАКРОМИЦЕТОВ ПРИ АЭРОТЕХНОГЕННОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ
Лянгузова И.В....109
УТИЛИЗАЦИЯ МЕДИЦИНСКИХ МАСОК МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ПОЧВЕННЫМИ ГРИБАМИ
Матевосян Р.Э., Шахазизян И.В., Маркарян Л.В., Петросян А.М., Нанагюлян С.Г. 112
АНТРОПОГЕННЫЙ СТРЕСС КАК ФАКТОР ВОЗДЕЙСТВИЯ НА АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ
Поляк Ю.М. 116
ДЕГРАДАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*
Позднякова Н.Н., Турковская О.В. 120
МИКРОКОЛОНИАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ГРИБОВ ЭКСТРЕМОФИЛОВ НА ФРЕСКАХ XII ВЕКА В СПАССКОМ ХРАМЕ СПАСО-ЕВРОСИНИЕВСКОГО МОНАСТЫРЯ
Ребрикова Н.Л. 125
РОЛЬ ФИТОСАНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ГОРОДСКИХ ПАРКОВЫХ ЗОН ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ ГОРОЖАН
Щербакова Т.И., Лунгу А.А., Кручеан Ш.М. 127

ОБСЕМЕНЕННОСТЬ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ ОБЪЕКТОВ СТАНКОВОЙ ЖИВОПИСИ
Шегурова А.Ф., Мануйлов С.И. 133
О ПЕРСПЕКТИВЕ ПРИМЕНЕНИЯ В МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ «ЗАЩИТНЫХ» КУЛЬТУР – ВЗГЛЯД ГИГИЕНИСТОВ
Шевелева С.А., Ефимочкина Н.Р., Смотрина Ю.В. 135
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ УТИЛИЗАЦИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ И ОЦЕНКА ПРОДУКТОВ ИХ КОНВЕРСИИ
Шонахунов Т. Э., Ахмедова З. Р., Яхяева М.А, Хамраева З.Т. 138
РАСТИТЕЛЬНЫЕ СУБСТРАТЫ КАК ИСТОЧНИК ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ В УСЛОВИЯХ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ЗОН
Смирнов А.Н., Смирнова О.Г., Васильченко В.В.....143
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ХИЩНЫМ ГРИБАМ-ГИФОМИЦЕТАМ В ГНЦ ВБ ВЕКТОР РОСПОТРЕБНАДЗОРА (КРАТКИЙ ОБЗОР)
Теплякова Т.В., Белая Т.Д. Ставский Е.А., Петровская И.Ф.....148
РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОМИЦЕТОВ – ДЕСТРУКТОРОВ БИОПЛАСТИКОВ
Тертышная Ю.В., Подзорова М.В. 153
ЗАЩИТА КОНСТРУКЦИОННЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГРИБОВ В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА С ПОМОЩЬЮ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА
Загустина Н.А., Алехова Т.А., Александрова А. В., Башаров А.А., Плотников А.Д. 158
МИКРОМИЦЕТЫ АНТРОПОГЕННЫХ ЗОН
Зайнитдинова Л.И., Жураева Р.Н., Лазутин Н.А., Мавжудова А.М. 162

Глава 13.
ЛЕКАРСТВА ИЗ ГРИБОВ

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГРИБА *PENICILLIUM CAMEMBERTI*
Аккузина С.Г., Кощеева С.С. 168
К ВОПРОСУ ОБ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКОТОКСИНА ПАТУЛИНА
Алмухтар О.А.Х., Джабир М.С., Цублова Е.Г.,Крылова И.Н. 170

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИЦЕЛИЯ ЩЕТИНИСТОВОЛОСОГО ТРУТОВИКА *INONOTUS HISPIDUS*
Бадалян С.М., Гарибян Н.Г.....171
ИНГИБИРОВАНИЕ *VERTICILLIUM DAHLIAE* ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩИМИ АКТИНОМИЦЕТАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ПОЧВ г. ТАШКЕНТА
Бекмухамедова Н.К., Ботирова И.С., Зайнитдинова Л.И., Мамиев М.С.....174
ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ СЕМЕЙСТВА *CORDYCIPITACEAE* - ПОТЕНЦИАЛ В МЕДИЦИНЕ
Богомолова А.А., Басалаева Д.Л., Осмоловский А.А.....179
СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИХ И ПЛАЗМОКОАГУЛИРУЮЩИХ ПРОТЕИНАЗ СРЕДИ МИКРОМИЦЕТОВ ОТДЕЛА MUCOROMYCOTA
Богуш М. А., Цао Ю.....180
РАСТИТЕЛЬНЫЕ ДЕФЕНСИНЫ КАК ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ ПЕПТИДЫ С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ
Финкина Е.И., Богданов И.В., Фатеева С.И., Шевченко О.В., Воропаев А.Д., Овчинникова Т.В. 184
АКТИВНОСТЬ МИКОЦИНОВ WICKERHAMOMYCES ANOMALUS ПРОТИВ АСКОМИЦЕТНЫХ ДРОЖЖЕЙ
Голубев В.И.....188
АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНО-СПИРТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ШТАММОВ *GANODERMA LINGZHI* ИЗ ФОНДА ИНСТИТУТА ЛЕСА НАН БЕЛАРУСИ
Горбацевич Г.И., Баталова И.Р., Зеневич Л.С., Коваленко С.А., Оганесян Л.В.....189
СКРИНИНГ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ОБРАЗЦОВ ИЗ ЧАГИ *INONOTUS OBLIQUUS* НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ЭКТРОМЕЛИИ
Кабанов А.С., Овчинникова А.С., Одношевский Д.А., Петровская И.Ф., Непомнящих Т.С., Пьянков О.В., Теплякова Т.В. 191
ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СУХИХ ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЛИШАЙНИКОВ И ЧАГИ НА РЕПЛИКАЦИЮ SARS-CoV-2 IN VITRO
Казачинская Е.И., Зайковская А.В., Иванова А.В., Пьянков О.В.....196

ЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ ПРЯНЫХ РАСТЕНИЙ УЗБЕКИСТАНА – ИСТОЧНИКИ АНТИКОАГУЛЯТНЫХ ВЕЩЕСТВ
Кузиева Н.Х., Абдульмянова Л.И., Гулямова Т.Г. 206
ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *ASPERGILLUS* КАК ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕАЗ С ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ
Лавренова В.Н., Шестакова А.А., Суркова Д.Е., Осмоловский А.А.....211
НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАЗОЛИДИН-2,4-ДИОНА И ИХ ГИБРИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ СРЕДСТВА
Левшин И.Б., Грамматикова Н.Э., Симонов А.Ю., Панов А.А., Польшаков В.И.....213
БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЕ ЭКСТРАКТЫ БАЗИДИОМИЦЕТОВ С АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ
Лысакова В. С., Рогожин Е. А., Синева О. Н., Краснопольская Л. М.....217
ВЛИЯНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА НА СИНТЕЗ ПРОТЕАЗ МИКРОМИЦЕТОМ ASPERGILLUS FUMIGATUS
Насибов Э.М., Никитина З.К. 219
АНТИБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛИХЕНИЗИРОВАННХ ГРИБОВ
Пчелкин А.В.....223
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ОБРАЗЦОВ ИЗ ЧАГИ INONOTUS OBLIQUUS НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ
Петровская И.Ф., Колосова И.В., Теплякова Т.В., Непомнящих Т.С. 227
ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТАНОЛЬНОГО ЭКСТРАКТА КУЛЬТИВИРУЕМОГО МИЦЕЛИЯ БАЗИДИОМИЦЕТА FOMES FOMENTARIUS
Проценко М.А., Филиппова Е.И., Макаревич Е.В., Серова О.А., Теплякова Т.В., Мазуркова Н.А.....231
НОВЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ И СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ
Садыкова В.С., Куварина А.Е., Рошка Ю.А., Кураков А.В., Георгиева М.Л.....236

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ
НОВОГО ШТАММА *HERICIUM ERINACEUS* ВР16
Широких А.А., Назарова Я.И., Широких И.Г. 238
БИОПРЕПАРАТЫ С АНТИБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ:
ПРОДУКТЫ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ С БАКТЕРИЯМИ
Цивилева О.М., Шатерников А.Н., Евсеева Н.В....242

Глава 14.
ГРИБНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ
И НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

БИОПРЕПАРАТЫ С АНТИБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ:
ПРОДУКТЫ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ С БАКТЕРИЯМИ
Абдулахадова Г.Ш....250
МЕЛАНИН И ПУЛЛУЛАН СИНТЕЗИРУЮЩАЯ
СПОСОБНОСТЬ ЭПИФИТА *AUREOBASIDIUM PULLULANS* L1,
АССОЦИИРОВАННОГО С БАРБАРИСОМ ОБЫКНОВЕННЫМ
(*BERBERIS VULGARIS*)
Буриева М.Р., Абдульмянова Л.И., Гулямова Т.Г. 253
ОБРАЗОВАНИЕ БИОАКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
СИБИРСКИМИ ШТАММАМИ *CORDYCEPS MILITARIS* (L.) FR.
Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П.,
Литовка Ю.А., Павлов И.Н.,
Долгачева Ю.А., Чистяков И.Н....258
МИЦЕЛЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ СЕМЕЙСТВА
OPHIOCORDYCIPITACEAE – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ
ПРОДУЦЕНТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ЭКЗОФЕРМЕНТОВ
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ
Басалаева Д. Л., Богомолова А. А., Осмоловский А. А....261
МОДИФИКАЦИЯ СПОР МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ
СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ
Бокарева Д.А., Мысякина И.С., Ванцян М.А....263
ВЫЯВЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА

НОВЫХ ШТАММОВ АГАРИКОМИЦЕТОВ В ПРОЦЕССЕ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
Чернышенко В.С., Максимова В.Ю., Гурина С.В., Ананьева Е.П., Псурцева Н.В. 267
ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ТИТАНА НА БИОСИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ АМИЛАЗ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 06
Кондрук В.Ф, Чилочи А. А., Клапко С.Ф., Дворнина Е. Г., Лаблюк С.В. 272
ЛАНОСТАНОИДЫ *INONOTUS OBLIQUUS* (ACH. EX PERS.) PIL T КАК СИНТОНЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
Кукина Т.П., Елшин И.А. 277
ОБРАЗОВАНИЕ И СВОЙСТВА КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS CLAVATUS* A16
Кулешова К. И., Попова Е. А. 281
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОЛЛЕКЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ ВОСТОЧНОЙ ПАЛЕАРКТИКИ
Лиховидов В.Е., Александрова А.В., Юскевич В.В. 285
БИОКОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ДЕЙСТВИЕМ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ФУЗИДИНА НАТРИЯ
Лияськина Е.В., Маврина А.С., Лияськина А.Ю., Тишкин А.А., Ревин В.В. 291
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГРИБНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ОРГАНИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ
Нугманова Т.А., Кабаргина М.В., Кабаргин Л.А. 295
РЕАНИМАЦИЯ КЛЕТОК ЛИОФИЛЬНО ВЫСУШЕННЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ
Пахомов Ю.Д., Блинкова Л.П. 298
ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ РАЗНЫХ МОРФОСТРУКТУР БАЗИДИОМИЦЕТА *LENTINULA EDODES* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С СИНТЕЗОМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ
Ветчинкина Е.П., Горшков В.Ю. 303

ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ШТАММОМ ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS* BDU-12
Зейналова Л.А., Керимова Л.А. 310
РАЗНОСТНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОЛИАМИНОВ ВЫЯВЛЯЕТ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ БИОСИНТЕЗА ЦЕФАЛОСПОРИНА С У *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*
Жгун А.А., Нураева Г.К., Хомутов М.А., Хомутов А.Р. 311
ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗЫ ГРИБАМИ РОДА *ASPERGILLUS*
Жуковская Л.А., Семашко Т.В. 314

Глава 15.
НОВЫЕ АНТИБИОТИКИ, АНТИМИКОТИКИ И ФУНГИЦИДЫ

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА И ЭФИРНОГО МАСЛА ЭСТРАГОНА (*ARTEMISIA DRACUNCULUS* L.)
Адамян Р.Г., Погосян А.В., Элоян И.М., Закарян Н.А., Нанагюлян С.Г. 318
ФУНГИЦИДНОЕ И ФУНГИОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА КЛЕТКИ КЛИНИЧЕСКОГО ИЗОЛЯТА *CANDIDA ALBICANS* FA-1
Андреева И.С., Ребус М.Е. 320
АНТИФУНГАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ОБРАЗУЕМЫХ АКТИНОМИЦЕТАМИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ КАЗАХСТАНА
Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Спанкулова Г.А., Татаркина Л.Г., Момбекова Г.А., Баймаханова Б.Б., Балгимбаева А.С., Треножникова Л.П. 326
ДИАЛКИЛ(АРИЛ)АМИДОФОСФАТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПЕРИМИЦИНА: ПОЛУЧЕНИЕ, ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ, РАЗРАБОТКА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ
Белахов В.В., Чистякова Т.Б., Смирнов И.А., Колодязная В.А. 329

АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЙНЫХ СОЛЕЙ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗОЛА
Белоусова З.П., Кленова Н.А., Нарыкина А.И., Гоглова А.В., Шорохова И.А., Барабошкина А.В., Кузнецова А.А.....333
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОЛОРАДСКИХ ЖУКОВ И ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ
Демьянкова М.В., Ефименко Т.А., Якушев А.В., Глухова А.А., Хуснетдинова Т.И., Садыкова В.С., Ефременкова О.В.....336
ФУНГИСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ Mn(II) С ФАРМАКОФОРНЫМИ ЛИГАНДАМИ, 1,10-ФЕНАНТРОЛИНОМ И ЕГО1,10-ФЕНАНТРОЦИАНИНОВЫМИ (БИ-1,10-ФЕНАНТРОЛИЛЕНОВЫМИ) ПРОИЗВОДНЫМИ – БИОМИМЕТИКОВ ПРИРОДНЫХ ФЕРМЕНТОВ: КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ
Демидов В.Н., Богомолова Е.В., Иванова А.Г., Ефимова Л.Н., Вощиков В.И., Пахомова Т.Б.....341
ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОЗИЦИОННОГО ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «ДЕКОНДЕЗ»
Ишков Ю.Н., Жаркова О.А., Пудова О.Б., Петрова А.П.....346
ОЦЕНКА ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ И ЭФИРНЫХ МАСЕЛ
Хараева З.Ф., Барокова Е.Б., Куйгенова Ф.Х., Эштрекова Э.А. 350
ВЛИЯНИЕ ПОЛИКАТИОНОВ НА МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ
Куликов С.Н., Хайруллин Р.З.....351
АНТИМИКОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АМФИФИЛЬНЫХ ДИСПЕРСИЙ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ КОБАЛЬТА И ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА
Кутырева М.П., Россова А.А., Халдеева Е.В., Ханнанов А.А. 355
АНТИГРИБНАЯ АКТИВНОСТЬ БИНОРАМА™ IN VITRO
Панчук С.В., Игнатов А.Н.....359
ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И ГИДРОЛАТОВ МОНАРДЫ. ЧАБРЕЦА И ЧАБЕРА ГОРНОГО НА РОСТ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ
Постникова О.Н.....362

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РАЗВИТИЯ И ЛЕЧЕНИЯ АЛЬВЕОЛИТА
Шулаков В.В., Просычева О.О., Подпорин М.С., Сейфуллаева Л.Р. 365
ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ АНТИМИКОТИКОВ
Синева О.Н., Маркелова Н.Н., Бычкова О.П., Иванкова Т.Д., Садыкова В.С. 368
АНТИМИКОТИКИ РАСТИТЕЛЬНОГО И МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
Асфха З.А., Романовский А. С., Травкин В.М., Соляникова И.П. 371
ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТИОКОНАЗОЛА, ПИРАКЛОСТРОБИНА И ФЛУДИОКСОНИЛА НА РОСТ *FUSARIUM OXYSPORUM* В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ
Сухова Е.А., Зорькина О.В., Нефедьева Е. Э., Грибуст И. Р., Колотова О. В. 372
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО, АНТИМИКОТИЧЕСКОГО И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ
Волчек И. А., Теряев А. С., Обернихина Н.И., Мичурина А. П. 376

Глава 16.
НОВЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕДИЦИНСКИ ЗНАЧИМЫХ ВИДОВ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*
Арашкова А.А., Летвинова В.С. 382
ОБНАРУЖЕНИЕ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФОРМ САЛЬМОНЕЛЛ В МОРСКОЙ ВОДЕ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»
Бынина М.П., Матосова Е.В., Белов Ю.А, Яковлев А. А., Щелканов М. Ю. 385
ВЗАИМОСВЯЗЬ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ОБЩЕГО АНАЛИЗА КРОВИ
Иксанова А.М., Ожован И.М., Арзуманян В.Г., Колыганова Т.И.,

Самойликов П.В. 387
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ
ПРОБОПОДГОТОВКИ МИЦЕЛИЯ
Иванов А. А., Тяпкин А. В., Голубева Т. С. 390
К ВОПРОСУ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТОДОВ
АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКИ «IN VITRO»
У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА
С ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ
Джалилова А.Н., Царуева Т.В.,
Джалилова Д.Н., Газиев Г.М. 395
ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИНАМИЧЕСКОЙ
МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ
БАКТЕРИЙ В МОРСКОЙ ВОДЕ
Матосова Е.В., Бынина М.П., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю. 396
МИКРОФЛОРА ЗЕВА У БОЛЬНЫХ
С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ
В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ
НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ
Полищук И.С. 400
ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РЕАКЦИИ КОАГГЛЮТИНАЦИИ ПРИ
ВЫЯВЛЕНИИ
B. PSEUDOMALLEI В ПОЧВЕННЫХ ПРОБАХ, ПОЛУЧЕННЫХ
НА ЭНДЕМИЧНОЙ ТЕРРИТОРИИ ВЬЕТНАМА
Рябинина Л.А., Терешко Д.Л., Тетерятникова Н.Н.,
Кулаков М.Я., Пушкарь В.Г., Новицкая И.В. 403
ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА
КЛИНОВИДНОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ (ТЕХНОЛОГИЯ
ЛИТОС-СИСТЕМА) ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ЭЛЕМЕНТОВ ГРИБА
РОДА CANDIDA SPP. И ЕГО АССОЦИАЦИЙ
С БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРОЙ
Шатохина И.С., Шатохина С.Н., Шабалин В.Н. 407
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ
СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К АЛЛЕРГЕНАМ
МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ
Желтикова Т.М., Мокроносова М.А. 409

Глава 17.
ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ

ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИАГНОСТИКА BIPOLARIS ZEICOLA НА ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУРАХ
Дудченко И.П, Кузнецова А.А., Дудченко Г.Н. 414
ФУЗАРИОЗ У РАСТЕНИЯ ЛЮЦЕРНА И ВИДОВОЙ СОСТАВ ЕГО ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
Гасанова В.Я. 417
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ И ИХ БОЛЕЗНИ
Холмуродов У.Э., Камилов Ш.Г., Халмурадов Э.А. 420
БОЛЕЗНИ И ПОРАЖАЕМОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ГРИБНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ
Холмуродов У.Э., Камилов Ш.Г., Халмурадов Э.А. 424
КОНТРОЛЬ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫЙ ВО ВНИИ ФИТОПАТОЛОГИИ
Коломиец Т.М., Киселева М.И., Пахолкова Е.В., Глинушкин А.П. 431
ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ В СИСТЕМЕ «РАСТЕНИЕ-ХОЗЯИН – ПАТОГЕН»
Сенашова В.А., Анискина А.А., Полякова Г.Г. 436
ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПОСЕВНЫЕ КАЧЕСТВА И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФАСОЛИ ЗАЛОТИСТОЙ (МАШ)
Сухоруков А.И., Авакумов А.Д. 440
НОВЫЕ БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ МУЛЬТИКОНВЕРТИРОВАННЫХ СУБСТРАТОВ
Титова Ю.А. 444
ДИНАМИКА И МЕХАНИЗМЫ КОЛОНИЗАЦИИ КОЛОСЬЕВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРОМИЦЕТАМИ
Торопова Е.Ю., Селюк М.П., Воробьева И.Г. 448
ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФАТМОБИЛИЗУЮЩЕЙ И АЗОТФИКСИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭДНОФИТНОЙ БАКТЕРИИ *BACILLUS TOYONENSIS* HG22
Туама А.А., Сабирова З.Р., Карамова Н.С., Сташевски З. 452

Научное издание

Успехи медицинской микологии

Том XXV

Издано Национальной Академией Микологии

Научное редактирование тома М.А. Сергеевой

Подписано в печать 01.05.2023 г.
Формат 60x90/16
Гарнитура «Minion Cyrillic»
Тираж 200 экз.