

Е. А. ОЛЕЙНИКОВА, И. Э. СМИРНОВА, М. Г. САУБЕНОВА

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИИ – АНТАГОНИСТЫ МИКРОМИЦЕТОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДЕРМАТОМИКОЗОВ

(Институт микробиологии и вирусологии МОН РК)

*Отобран вариант целлюлолитических бактерий **Brevibacterium erythra** 38BK16(10)-90-NaCl, характеризующийся выраженным антагонизмом против грибов эпидермофитов. Вследствие подбора оптимальных условий культивирования фунгицидная активность варианта в отношении **T. gypsum** повышена на 47%, фунгистатическая активность в отношении **E. Kaufmann-Wolf** – на 181%.*

Вследствие ухудшения экологии и широкого применения антибиотиков, кортикостероидных и цитотоксичных препаратов, приводящих наряду с другими факторами к увеличению числа врожденных и приобретенных иммунодефицитов, глобальное распространение получили дермато-

микозы и грибковые поражения слизистых оболочек [1–4]. По данным ВОЗ 20% населения земного шара страдают грибковыми заболеваниями. Дерматомикозы занимают второе-третье место в общей структуре дерматозов в Казахстане, к тому же их лечение осложняется наличием у больных

иммунодефицита, обусловленного хронической патологией различных органов и систем организма [5]. Микозы являются одним из постоянных спутников хронических диффузных заболеваний печени [6]. Многими авторами отмечается настоятельная потребность в эффективных противогрибковых препаратах, не вызывающих вредных для организма реакций и появления резистентных форм микроорганизмов [2, 7–9]. Литературные данные о возможности подавления грибов эпидермофитов с помощью бактерий-антагонистов практически отсутствуют. В Институте микробиологии и вирусологии МОН РК получены ассоциации молочнокислых бактерий, подавляющие рост грибов эпидермофитов [10]. Воздействие же целлюлолитических бактерий на патогенные для человека и животных грибы не исследовано.

Целью работы было выявление целлюлолитических бактерий, обладающих выраженным антагонизмом в отношении грибов эпидермофитов, и подбор наиболее благоприятных условий культивирования для проявления противогрибковой активности бактериальных культур.

Материалы и методы. Объектами исследования служили целлюлолитические бактерии *Bacillus cytaseus* 21N, *Bacillus cytaseus* 21№8, *Bacillus flavigena* 22TN, *Brevibacterium erythra* 38BKI(6)10, *Cellulomonas effusa* 60(5)4, *Cellulomonas effusa* 60(9)9/3 из коллекции лаборатории физиологии и селекции микроорганизмов, их варианты (всего 90), отселекционированные под влиянием различных химических и физических факторов [11], и целлюлолитические бактерии преимущественно из рода *Bacillus* (19 культур), выделенные в 2003–2004 гг. из различных источников. Тест-культурами служили патогенные для человека и животных грибы *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*, *Trichophyton gypseum*, *T. rubrum*, полученные из Казахского кожно-венерологического института.

Культивирование бактерий проводили на чашке (180 об/мин), а также на твердой питательной среде Гетчинсона при температуре 28–30 °С. Грибы выращивали на среде Сабуро, посев для определения антагонистической активности бактерий проводили из споровой накопительной культуры (3–5 мл на 100 мл среды). Антагонистическую активность определяли методом диффузии в агар с внесением культуральной жидкости

в лунки. Для подавления роста бактерий в среду вносили антибиотик хлорамфеникол в количестве 400 мг/мл среды. Оптическую плотность (ОП) культуральных жидкостей определяли на фотоэлектроколориметре ФЭК-56М-У4.1. Для выявления влияния источника углерода на антагонистическую активность бактерий использовали пшеничную и кукурузную солому, пшеничные отруби, Na-карбоксиметилцеллюлозу (Na-КМЦ) (20 г/л), глюкозу, лактозу, растворимый и нерастворимый крахмал, натрий лимоннокислый и натрий яблочнокислый (10 г/л). В качестве источника азота использовали NaNO_3 , NaNO_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , мочевины (количество определяли по содержанию азота в исходной среде Гетчинсона – 0,415 г/л), пептон (1,0; 2,5; 5,0 г/л), аминокислоты лейцин, аланин, триптофан (1 г/л), соевую муку, кукурузную крупу (10 г/л), аммонийные соли также комбинировали с NaNO_3 . Статистическую достоверность результатов определяли по величине нормированного отклонения для $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Почти все отселекционированные варианты полностью подавляли рост грибов эпидермофитов *T. gypseum* и *E. Kaufmann-Wolf*, широко разрастаясь за пределы лунки. Это позволяет предположить, что антагонизм в данном случае может быть обусловлен более высокой скоростью роста бактерий и их конкуренцией за питательные вещества среды. Антагонизм целлюлолитических бактерий в отношении *T. rubrum* был менее выражен, около трети вариантов вызывали лишь подавление воздушного мицелия гриба. При внесении в среду антибиотика рост грибов *T. gypseum* и *E. Kaufmann-Wolf* ингибировали лишь 14 культур, 7 из которых подавляли рост обоих грибов. Полученные данные указывают на то, что основным механизмом воздействия целлюлолитических бактерий на грибы эпидермофиты служит конкуренция за источники питания и место в экологической нише, в частности более высокая скорость роста бактерий в сравнении с грибами. Поскольку поверхность кожи человека и животных не является естественной средой обитания целлюлолитических бактерий, то при отборе бактерий-антагонистов предпочтительным механизмом воздействия считали продукцию ими противогрибковых соединений в среду культивирования. Поэтому все последующие опыты

проводили только на среде с антибиотиком. Для дальнейшей работы был отобран вариант *Brev. erythra* 38BK16(10)-90-NaCl, характеризующийся наиболее выраженным подавлением роста грибов *T. gypseum* и *E. Kaufmann-Wolf*.

Исследовано влияние источников углеродного и азотного питания, а также сроков и условий культивирования на антагонистическую активность *Brev. erythra* 38BK16(10)-90-NaCl в отношении грибов эпидермофитов.

Наибольшую антагонистическую активность варианта отмечали у шестисуточных культур при росте на всех источниках углерода, лишь на среде с лактозой активность была более высокой на вторые-третьи сутки культивирования (табл. 1). Оптимальным для роста отселекционированных бактерий источником углерода являлись пшеничные отруби. Оптическая плотность культуральной жидкости на среде с отрубями достигала 12,7. Антагонистическая же активность была примерно такой, как и на средах с Na-КМЦ, крахмалом (растворимым и нерастворимым) и глюкозой, тогда как при росте на этих средах бактерии накапливали в 2 (а на глюкозе в 3) раза меньше биомассы. На средах с пшеничной и кукурузной соломой рост бактерий был достаточно хорошим. Антагонистическая активность в отношении обоих грибов была максимальна при культивировании бактерий на среде Гетчинсона с кукурузной соломой в качестве источника углерода.

Рост бактерий на средах с минеральными источниками азота, аминокислотами, мочевиной и на среде с 1 г/л пептона был слабым, антагонистическая активность также была невысокой. Наименьшие зоны подавления роста грибов *T. gypseum* и *E. Kaufmann-Wolf* выявлены на средах с аминокислотами и пептоном в количестве 1,0 и 2,5 г/л, наибольшие – с кукурузной крупой (на 40% больше, чем на исходной среде с 2,5 г/л NaNO_3).

При выдерживании посевов в течение 10–14 сут зоны подавления роста *E. Kaufmann-Wolf* полностью зарастали грибом при использовании среды Сабуро с антибиотиком. У *T. gypseum* зоны зарастали лишь наполовину, т. е. влияние на *T. gypseum* было сочетанным: фунгистатическим и фунгицидным, а на *E. Kaufmann-Wolf* – фунгистатическим. Устойчивых форм гриба *T. gypseum* в зоне подавления роста не возникало при продолжении культивирования до двух месяцев.

Выявлено, что большое влияние на результаты эксперимента оказывает объем среды, в которой происходит культивирование бактерий (кроме среды с глюкозой). Оптимальной средой для выращивания посевной культуры *Brev. erythra* 38BK16(10)-90-NaCl в целях проявления максимальной активности варианта в отношении *E. Kaufmann-Wolf* является агаризованная среда Гетчинсона с отрубями в качестве источника углерода (табл. 2), при этом культивировать

Таблица 1. Влияние источника углерода в среде и времени культивирования на антагонистическую активность *Brev. erythra* 38BK16(10)-90-NaCl в отношении грибов дерматофитов

Источник углерода	ОП культуральной жидкости	Диаметр зон подавления роста грибов, мм					
		<i>E. Kaufmann-Wolf</i>			<i>T. gypseum</i>		
		2 сут.	3 сут.	6 сут.	2 сут.	3 сут.	6 сут.
Пшеничная солома	8,30	21,5±0,5	34,0±2,2	39,0±3,2	17,5±0,5	20,8±0,5	31,0±2,0
Кукурузная солома	8,20	29,5±1,3	33,5±1,9	38,0±2,8	22,0±0,5	24,8±1,3	37,0±1,0
Пшеничные отруби	12,7	22,5±1,8	32,0±1,5	35,0±2,7	23,0±1,0	21,5±0,7	34,5±1,5
Na-КМЦ	6,00	23,5±2,1	32,0±2,4	35,0±1,8	18,0±1,0	20,5±0,5	39,0±3,1
Крахмал нерастворимый	6,55	26,5±1,2	19,5±0,9	36,5±3,0	21,5±1,5	23,5±1,0	34,5±1,3
Крахмал растворимый	5,88	21,0±0,8	23,0±2,0	34,0±2,1	23,3±1,8	18,0±1,0	34,0±3,0
Глюкоза	4,10	19,5±0,3	32,5±3,7	34,0±1,9	21,0±2,1	21,3±0,6	31,0±2,5
Лактоза	3,04	20,0±0,5	18,0±1,0	14,3±0,5	22,0±2,0	22,5±1,7	19,3±1,0
Na-лимон-нокислый	4,67	17,0±1,0	20,0±1,0	23,0±0,7	14,5±0,5 (30,0*)	20,0±1,0 (35,0*)	20,0±1,0
Na-яблочно-кислый	4,90	21,5±0,0	20,5±0,5	25,0±0,6	19,0±0,5 (40,0*)	21,0±1,5 (30,0*)	22,0±1,5

* Подавление воздушного мицелия, $p < 0,05$.

Таблица 2. Влияние посевной культуры и условий культивирования на антагонистическую активность *Brev. erythra* 38VKI6(10)-90-NaCl в отношении грибов эпидермофитов ($p < 0,05$)

Среда культивирования посевной культуры	Объем среды в колбах на 250 мл, мл	ОП культуральной жидкости	Диаметр зон подавления роста грибов, мм			
			<i>E. Kaufmann-Wolf</i>		<i>T. gypseum</i>	
			Через 5 сут.	Через 30 сут.	Через 5 сут.	Через 30 сут.
Жидкая с глюкозой	50	12,0	40,0±2,0	0	25,0±1,0	15,0±0,5
	100	9,8	39,0±3,0	0	28,0±0,5	17,0±1,0
Жидкая с пшеничной соломой	50	11,6	45,0±1,5	0	25,0±0,5	16,0±0,5
	100	11,9	40,0±2,0	0	21,0±1,0	0
Агаризованная с отрубями	50	12,0	55,0±3,0	0	23,0±1,5	15,0±0,5
	100	10,9	39,0±2,5	0	20,0±0,5	0

посевы следует в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды. Для максимального проявления антагонизма варианта в отношении *T. gypseum* требуются более низкая аэрация среды (100 мл) и выращивание посевной культуры на жидкой среде Гетчинсона с глюкозой.

Повышение содержания дрожжевого экстракта в среде с 1 до 4 г/л приводило к значительной стимуляции роста культуры. Оптическая плотность культуральной жидкости повышалась на 46–70% в зависимости от источника углерода в среде. При этом статистически достоверное повышение антагонистической активности культуры в отношении *E. Kaufmann-Wolf* выявлено лишь при культивировании на средах с Na-КМЦ и крахмалом в качестве источника углерода. Наибольшие зоны задержки роста гриба после подбора оптимальных условий культивирования посевной культуры выявлены при росте бактерий на среде с отрубями (68 мм). Увеличение диаметра зон подавления роста *T. gypseum* при повышении содержания дрожжевого экстракта в среде составляло 11–33% в зависимости от источника углерода в среде. Максимальные зоны подавления роста *T. gypseum* (40 мм) отмечены на среде Гетчинсона с отрубями и 4% дрожжевого экстракта. Однако в течение месяца зоны на этой среде зарастали до 17 мм. Между тем при культивировании варианта на исходной среде с кукурузной или пшеничной соломой зоны подавления роста гриба не изменялись в течение месяца, т. е. культура обладала выраженной фунгицидной активностью.

Путем подбора оптимальных источников питания и наиболее благоприятных условий культивирования *Brev. erythra* 38VKI6(10)-90-NaCl была повышена фунгистатическая активность варианта в отношении *E. Kaufmann-Wolf* на 181%

(с 24 до 68 мм в диаметре зон). Фунгицидная активность в отношении *T. gypseum* повышена с 15 до 22 мм (на 47%), диаметр зон подавления роста этого гриба через 5 сут составлял 36–40 мм, что на 57–74% выше начальных значений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Родионов А.Н. Грибковые заболевания кожи: Руководство для врачей. СПб.: Питер, 1998. 281 с.
2. Breitenbach M., Crameri R., Lehrer S.B. Fungal allergy and pathogenesis. Basel. Karger, 2002. 310 p.
3. Дербинская Г.М. Этиологический подход к лечению микозов стоп // Вопросы дерматологии и венерологии. 2001. № 1. С. 57-61.
4. Нечаева Е.В., Хан Е.А. Эффективность применения орунгала при лечении дерматомикозов // Вопросы дерматологии и венерологии. 2001. № 2. С. 36-40.
5. Кешилева З.Б., Кабыкенова Р.К., Дерябин П.Н. Новые технологии в дерматовенерологии // Вопросы дерматологии и венерологии. 2001. № 1. С. 4-6.
6. Осипова С.А., Оразымбетова Д.А., Кайжигалина З.К. Особенности экзематизации микотического процесса // Вопросы дерматологии и венерологии. 2004. № 1-2. С. 68-70.
7. Deere G.S. Prospects for development of fungal vaccines // Clinical microbiology reviews. 1997. V. 10, N4. P. 585-596.
8. Колбин А.С., Клишко Н.Н., Карнов О.И. Нежелательные эффекты системных антимикотиков // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48, № 8. С. 37-43.
9. Катлинский А.В., Сазыкин Ю.О., Бибикова М.В., Орехов С.Н. Антифунгальные агенты. Новые предпосылки их создания и новые трудности // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48, №9. С. 20-27.
10. Пузыревская О.М., Никитина Е.Т., Саубенова М.Г., Байжомартова М.М. Консорциум молочнокислых бактерий и дрожжей *Streptococcus lactis* П-1, *Lactobacillus bulgaricus* С-5, *Streptococcus cremoris* К-2 и *Saccharomyces lactis* 13, обладающий противогрибковой и антибактериальной активностью: Пред. патент РК № 13331. Оpubл. 15.08.2003. Бюл. № 8.
11. Смирнова И.Э., Саубенова М.Г., Олейникова Е.А. Новые варианты целлюлолитических бактерий с повышенной целлюлозной активностью // Биотехнология. Теория и практика. 2004. №2. С. 18-25.

Резюме

Эпидермофит саңырауқұлақтарына қарсы айқын антагонизммен ерекшеленген *Brevibacterium erythra* 38BKІ6(10)-90-NaCl целлюлолиттік бактериялары іріктелініп алынды. Өсу жағдайын жақсартқаннан кейін *T. gyp-seum*-ге фунгициттік белсенділігі 47% көтерілді, ал *E. Kauf-mann-Wolf*-ке фунгистатиттік белсенділігі 181% артты.

Summary

Variant of cellulolytic bacteria *Brevibacterium erythra* 38BKІ6(10)-90-NaCl with high antagonistic activity against fungal dermatophytes was selected. The fungicidal activity of the variant against *T. gypseum* and fungistatic activity against *E. Kaufmann-Wolf* were increased on 47% and 181% accordingly.