

УДК 579.841

И. Э. СМИРНОВА, Г. М. ПИЧХАДЗЕ, Р. Ш. ГАЛИМБАЕВА

РАЗРАБОТКА БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕРМАТОМИКОЗОВ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы

Впервые показана способность целлюлолитических бактерий подавлять рост и развитие дерматофитов, вызывающих микозы человека и животных. Отобрано восемь штаммов целлюлолитических бактерий, характеризующихся наиболее высокой антагонистической активностью по отношению к дерматофитам, перспективных для получения биопрепаратов для лечения микозов.

Заболевания, вызываемые микроскопическими грибками, являются распространенным видом патологии человека и животных. Это связано с резким увеличением числа факторов риска развития микозов, а также с изменением окружающей среды. К таким факторам относятся антибиотикотерапия, часто необоснованная, длительное пребывание в палатах интенсивной терапии, проведение реанимационных мероприятий и инфузционной терапии (включая катетеризацию и гипералimentацию), использование глюокортикоидных и иммуносупрессивных препаратов, ухудшение экологии, увеличение числа домашних животных. Проблемой микозов занимаются учеными практически всех специальностей. В урологии в этиологической структуре воспалительных заболеваний 11-12% составляют грибы (преимущественно рода *Candida*). В онкогематологии актуален вопрос развития аспергиллеза и кандидоза на фоне проведения химиотерапии и иммуносупрессивной терапии. Пульмонологи встречаются в основном с такими возбудителями пневмомикозов, как *Candida*, *Cryptococcus* и *Aspergillus*. Кроме того, известна роль грибов при респираторных аллергозах и бронхиальной астме. Все эти заболевания характеризуются длительным рецидивирующими течением, что способствует возникновению устойчивых форм возбудителей и снижает эффективность лечебных мероприятий, вызывает необходимость увеличения лечебных доз препаратов, усиливает их вредное побочное действие [1, 2].

Дermatomikozы человека и животных являются одной из самых распространенных инфекций, которая является не только медицинской, но и социальной проблемой. В настоящее время практически нет ни одной страны, в которой не были бы зарегистрированы случаи микозов человека и животных [3]. Dermatomikozы относятся к микозам с глобальным распространением и обладают высокой контагиозностью для людей и домашних животных, находящихся в непосредственном контакте друг с другом. Данные грибковые болезни характеризуются длительностью, стойкостью к противогрибковым препаратам, частыми рецидивами, осложнениями вторичных инфекций, сенсибилизацией всего организма [4].

В Казахстане, также как и во всем мире, из-за повсеместно отмечаемого нарушения экологического равновесия, некорректного применения антибиотиков и других лекарственных препаратов, широкое распространение получили микозы человека и животных различной локализации. По наблюдениям казахстанских специалистов, микромицеты осложняют оперативные вмешательства, являются причиной системных трудноизлечимых микозов, имитируют онко- и туберкулезные заболевания. Недостаток специалистов микологов, доступных отечественных препаратов и высокая стоимость импортных лекарств усугубляют проблему. Кроме того, лечебные препараты импортного происхождения имеют ряд нежелательных побочных эффектов при применении. Прогнозируется, что микозы будут наиболее распространенными болезнями недалекого будущего. Их стремительному распространению способствует снижение иммунного статуса человека, стрессы, возросшая химизация быта, неправильное питание и другие факторы [5]. Все это вызывает необходимость разработки эффективных отечественных препаратов для борьбы с микозами. Традиционно поиск новых актиномицетов ограничивается преимущественно исследованием метаболитов мицелиальных микроорганизмов, а именно, актиномицетов и грибов.

Бактерии в этом плане изучены значительно меньше, несмотря на то, что их физиологические свойства, в частности, способность роста и быстрая смена генераций является безусловным достоинством для использования в медицинской биотехнологии.

Ранее нами была обнаружено, что целлюлолитические бактерии обладают антагонистической активностью по отношению к широкому ряду плесневых и фитопатогенных грибов, что свидетельствует об их высокой фунгицидной активности. Также было установлено, что степень антагонистической активности находится в прямой зависимости от их способности расщеплять целлюлозу [6]. Логично было предположить, что данные микроорганизмы обладают антагонистической активностью и в отношении грибов, вызывающих дерматомикозы человека и животных.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили целлюлолитические бактерии из коллекции лаборатории, относящиеся к родам *Bacillus*, *Bacterium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Flavobacterium*. В качестве тест-культур использовали *Trichophyton gypseum*, *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*, *Ep. rubrum*, вызывающих микозы человека и животных, а также патогенные дрожжи *C. guilliermondii*.

Культивирование бактерий проводили на среде Гетчинсона с 1% пшеничной соломы в качестве источника нативной целлюлозы. Для выращивания дерматофитов использовали среду Сабуро.

Определение антибиотической активности проводили методом агаровых блоков [7].

Результаты исследований были статистически обработаны с использованием критерия Стьюдента и измерения считали достоверными при $p \leq 0,05$ [8].

Результаты и их обсуждение

С целью выявления штаммов целлюлолитических бактерий, обладающих антифунгальной активностью, было протестировано более 125 культур микроорганизмов и выявлено 45 наиболее перспективных штаммов - антагонистов. Для проверки их жизнеспособности культуры высевали на твердую среду Гетчинсона с пшеничной соломой в качестве источника углерода и энергии. Установлена сохранность жизнеспособности культур, однако отмечено некоторое снижение целлюлазной активности штаммов. Поскольку ранее была установлена прямая корреляция между целлюлазной и антагонистической активностью, была проведена активация роста и развития штаммов, обладающих антифунгальными свойствами и являющихся перспективных для дальнейшего отбора. С этой целью культуры пересевали на элективные среды: травяной отвар с ксилозой и сухим клевером, среда Гоулда-Декстера в течение двух недель с промежутком между пересевами в два-три дня. Далее провели проверку чистоты культур методом прямого высева на твердые среды и микрокопированием под вазелиновым маслом.

Для изучения антагонистической активности, тесно связанной с его жизнедеятельностью необходимо точное определение таксономического положения культур. Для идентификации бактерий исследовали их морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки.

При исследовании микроморфологических признаков изучали форму и размеры клеток бактерий, выявляли их подвижность, характер жгутикования, выявляли наличие или отсутствие спорообразования, а также способность клеток бактерий окрашиваться по Грамму. Для изучения морфологических и культуральных признаков изучали рост колоний на твердых средах, отмечая следующие признаки: форму, размеры, цвет и поверхность колоний, а также их край, структуру и консистенцию. Описание колоний дополняли описанием их роста по штриху.

Для исследования физиолого-биохимических признаков бактерий была изучена способность бактерий утилизировать различные углеводороды и спирты, взятые в качестве единственных источников углеводорода и энергии. Было показано, что утилизация углеводородов и спиртов бактериями значительно варьировалась в зависимости от культуры, часть бактерий утилизировала глюкозу, фруктозу, сахарозу и другие сахара с образованием кислот. Также было изучено отношение культур к кислороду, их оксидазная и каталазная активности, способность к образованию индола, аммиака, сероводорода, способность разжигать желатину и восстанавливать нитраты.

На основе изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков бактерий установлено, что 15 культур относятся к роду *Bacillus*, 9 культур к роду *Bacterium*, 8 - *Cellulomonas*, 7 - *Pseudomonas*, 3 - *Flavobacterium* и 3 штамм к роду *Brevibacterium*.

Далее было проведено изучение антагонистической активности 45 отобранных культур бактерий по отношению к грибам *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*, *E. rubrum*, *Trichophyton gypseum*, вызывающих такие заболевания человека и животных как эпидермофития и трихофития человека и животных.

Впервые было показано, что целлюлолитические бактерии подавляют рост и развитие патогенных грибов *Trichophyton gypseum*, *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*, *E. Rubrum* и дрожжей рода *Candida* (*C. guilliermondii*). Выявлено, что 21 культура целлюлолитических бактерий полностью подавляют рост грибов *T. gypseum* и *E. Kaufmann-Wolf* на среде Сабуро (рис.).

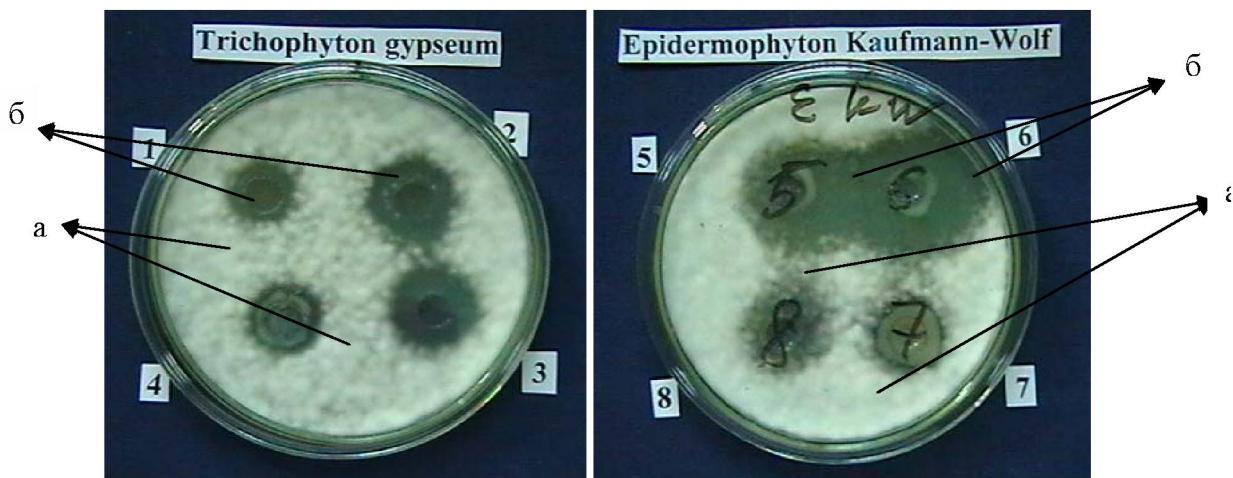


Рис. 1. Влияние штаммов целлюлолитических бактерий на патогенные грибы *Trichophyton gypseum*, *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*:
а - рост гриба по газону чашки; б - зоны подавления роста гриба целлюлолитическими бактериями

При этом не отмечали разрастания целлюлолитических бактерий за пределы лунки. Установлено, что из 45 исследованных бактерий 27 культур обладали фунгицидным влиянием на патогенный гриб *E. rubrum*, подавляя их рост и развитие, 12 штаммов имели фунгистатическую активность, выражавшуюся в частичном или полном подавлении образования воздушного мицелия и спорообразования. В ряде вариантов отмечено также изменение цвета пигментации культур грибов. В результате проведенного скрининга было выявлено 20 культур, обладающих высокой антагонистической активностью по отношению к дерматофитам. Их них отобрали восемь штаммов, характеризующихся наиболее высокой антагонистической активностью по отношению к дерматофитам и дрожжам *C. guilliermondii*, из которых три штамма относятся к роду *Bacillus*, два к роду *Cellulomonas*, два штамма к роду *Brevibacterium* и один к роду *Pseudomonas*.

Поскольку целлюлолитические организмы ранее не использовали в медицинской практике и они являются природными антагонистами микромицетов, следует ожидать отсутствия устойчивости и быстрого привыкания к биопрепаратаам, созданным на их основе. Поэтому возможна разработка высокоэффективных биопрепараторов нового поколения с использованием целлюлолитических бактерий родов *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas* для борьбы с микозами человека и животных. Кроме того, производство бактериальных препаратов может быть наложено на основе простых и доступных сред, приготовленных с использованием целлюлозосодержащих субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1 Alexander B.P., Perfect J.R. Antifungal resistance trends towards the year 2000. Implications for therapy and new approaches // Drugs. – 1997. – Vol. 54. – P. 657-678.

2 Theis T., Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications // Cell Mol. Life Sci. – 2004. – Vol. 61. – P. 437-455.

- 3 Клясова Г.А. Микотические инфекции: клиника, диагностика, лечение // Инфекции и антимикробная терапия. – 2000. – Т. 2, № 6. – С. 184-189.
- 4 Козлов Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – № 1, т. 2. – С. 16-30.
- 5 Степанова Ж.В., Новоселов А.Ю., Воробьев И.А. и др. Результаты клинического изучения крема «Тербизил» при лечении микозов гладкой кожи. *Consilium medicum. Приложение // Дерматовенерология.* – 2004. – С. 5-7.
- 6 Мохамад Ю. Клинико-эпидемиологические особенности микроспории в современных условиях и разработка лечения новыми медикаментозными средствами: Автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 1996. – 18 с.
- 7 Егоров Н.С. Микроны-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. – М.: Высшая школа, 1965. – 221 с.
- 8 Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1967. – 328 с.

I. Э. Смирнова, Г. М. Пичхадзе, Р. Ш. Галымбаева

**ДЕРМАТОМИКОЗ АУРУЛАРЫН ЕМДЕУ ҮШИН
ЦЕЛЛЮЛОЛИТТИК БАКТЕРИЯЛАР НЕГІЗІНДЕ БИОПРЕПАРАТ АЛУ**

Адам және жануарлардың микоз ауруын тудыратын демотофиттердің дамуын целянолиттік бактериялар тоқтататыны алғаш рет көрсетілді. Микоз ауруын емдейтін биопрепараттарды алу үшін қажетті, дерматофиттерге жоғары антигонистік қасиет көрсететін целянолиттік бактериялардың сегіз штамы сұрыпталып алынды.

I. E. Smirnova, G. M. Pichkhadze, R. Sh. Galimbayeva

**DEVELOPING BIOPREPARATIONS FOR CAUSING DERMATOMYCOSIS
ON THE BASIC OF THE CELLULOLYTIC BACTERIA**

Cellulolytic bacteria were for the first time shown to inhibit growth and development of dermatophytes, causing mycoses of human and animals. Eight strains of the cellulolytic bacteria with high antagonistic activity against these pathogens were selected. This strains may be using as perspective for developing of medical biopreparations.