

EDITORIAL BOARD

Chief Editor —

N.P. Yelinov — Ph.D., prof. (Russia)

Deputies Chief Editor —

N.V. Vasilyeva — Ph.D., prof. (Russia)

N.N.Klimko — M.D., prof. (Russia)

Responsible secretary —

T.S. Bogomolova — Ph.D. (Russia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

N.A. Belyakov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), J. Bennett — M.D. (USA), S.A. Burova — M.D., prof. (Russia), B. Dupont — M.D. (France), O.G. Hurzilava — M.D., prof. (Russia), V.I. Golubev — Ph.D. (Russia), Z.O. Karayev — M.D., prof. (Azerbaijan), K.P. Kashkin — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), V.G. Kubas' — M.D., prof. (Russia), A.V. Lipnizky — M.D., prof. (Russia), V.I. Mazurov — M.D., academician of RAMS, prof. (Russia), Iu.A. Medvedev — M.D., prof. (Russia), A.K. Mirzabalaeva — M.D., prof. (Russia), S.M. Ozerskaya — Ph.D. (Russia), I. Polachek — M.D. (Israel), Ye.V. Pronina — M.D., prof. (Russia), A.G. Rakhmanova — M.D., prof. (Russia), K.I. Raznatovsky — M.D., prof. (Russia), F.P. Romanyuk — M.D., prof. (Russia), A.V. Samzov — M.D., prof. (Russia), N.V. Shabashova — M.D., prof. (Russia), M.A. Shevyakov — M.D., prof. (Russia), A.V. Sobolev — M.D., prof. (Russia), A.A. Stepanova — Ph.D. (Russia), H.J. Tietz — M.D. (Germany), T.N. Trofimova — M.D., prof. (Russia), M.A. Viviani — M.D. (Italy), V.A. Zinzerling — M.D., prof. (Russia)

PROBLEMS IN MEDICAL MYCOLOGY

Vol. 16, № 4, 2014

North-Western State Medical University
named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute
of Medical Mycology (KRI MM)

ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 16, № 4, 2014

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт
медицинской микологии им. П.Н.Кашкина
(НИИ ММ)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор —

Н.П. Елинов — д.б.н., профессор (Россия)

Заместители главного редактора:

Н.В. Васильева — д.б.н., профессор (Россия),

Н.Н. Климов — д.м.н., профессор (Россия)

Ответственный секретарь —

Т.С. Богомолова — к.б.н. (Россия)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Н.А. Беляков — д.м.н., акад. РАМН, профессор (Россия),
Дж. Беннетт — доктор медицины (США), С.А. Бурова —
д.м.н., профессор (Россия), М.А. Вивиани — доктор
медицины (Италия), В.И. Голубев — д.б.н., вед.н.с.
(Россия), Б. Дюпон — доктор медицины (Франция),
З.О. Караев — д.м.н., профессор (Азербайджан),
К.П. Кашкин — д.м.н., академик РАМН, профессор
(Россия), В.Г. Кубас' — д.м.н., профессор (Россия),
А.В. Липницкий — д.м.н., профессор (Россия),
В.И. Мазуров — д.м.н., акад. РАМН, профессор
(Россия), Ю.А. Медведев — д.м.н., профессор (Россия),
А.К. Мирзабалаева — д.м.н., профессор (Россия),
С.М. Озерская — д.б.н. (Россия), И. Полачек —
доктор медицины (Израиль), Е.В. Пронина — д.м.н.,
профессор (Россия), К.И. Разнатовский — д.м.н.,
профессор (Россия), А.Г. Рахманова — д.м.н.,
профессор (Россия), Ф.П. Романюк — д.м.н.,
профессор (Россия), А.В. Самцов — д.м.н., профессор
(Россия), А.В. Соболев — д.м.н., профессор (Россия),
А.А. Степанова — д.б.н. (Россия), Х.Й. Титц — доктор
медицины (Германия), Т.Н. Трофимова — д.м.н.,
профессор (Россия), О.Г. Хурцилава — д.м.н., проф.
(Россия), В.А. Цинзерлинг — д.м.н., профессор
(Россия), Н.В. Шабашова — д.м.н., профессор (Россия),
М.А. Шевяков — д.м.н., профессор (Россия)

Проблематика журнала: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской микробиологии — биология возбудителей, клиника, диагностика, эпидемиология, иммунитет, терапия и профилактика инфекций, микроорганизмы-контаминанты в лабораторных, клинических и других условиях.

Editorial policy: The Journal «Problems in Medical Mycology» specializes in original articles that describe innovative research on all aspects of Medical Mycology — biology of pathogens, clinic, diagnostic, epidemiology, immunity, therapy and prophylaxis of infections, microorganisms — contaminants in laboratory, clinical and other conditions.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ И ОБЗОРЫ

Липницкий А.В., Антонов В.А., Маркин А.М. Новое в таксономии возбудителей эндемических микозов (обзор) . . . 3

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКОЛОГИЯ

Серкова М.Ю., Ткаченко Е.И., Авалуева Е.Б., Орлов С.В., Иванов С.В., Шевяков М.А. Кишечный биотоп у пациентов с раком легкого, получающих химиотерапию 8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МИКОЛОГИЯ

Ямагучи М., Шимицу К., Кавамото С., Степанова А.А., Васильева Н.В. Ультраструктурное исследование клеточных компонентов в ходе почкования *Malassezia pachydermatis* 13

Голубев В.И. Микоциночувствительность телеоморф и видов криптококков порядка Tremellales 19

Ананьева Е.П., Караваева А.В., Соловский М.В. Антимикробная активность полимерных комплексов антибиотика амикацина 22

Рябинин И.А., Чилина Г.А., Богомолова Т.С., Михайлова Ю.В. Необычные варианты *Aspergillus* spp. в культуре . . 26

Степанова А.А., Васильева Н.В., Пинегина О.Н. Сканирующая электронная микроскопия биопленок уретральных и венозных катетеров 32

Свистова И.Д., Корецкая И.И. Накопление опасных для человека почвенных микромицетов в зоне влияния автомагистрали «Дон» 38

Доршакова Е.В., Елинов Н.П., Мамошин А.Н. Изучение роста *Stachybotrys* spp. на различных образцах растительных материалов 41

Пинегина О.Н., Рауш Е.Р., Васильева Н.В. Определение чувствительности к антимикотикам *Candida* spp. в составе биопленок 46

CONTENTS

PROBLEM ARTICLES AND REVIEWS

Lipnitsky A.V., Antonov V.A., Markin A.M. Novation in the taxonomy of causative agents of endemic mycoses (review) . . . 3

CLINICAL MYCOLOGY

Serkova M.Yu., Tkachenko E.I., Avalueva E.B., Orlov S.V., Ivanov S.V., Shevyakov M.A. Intestinal biotop at patients with lung cancer receiving chemotherapy 8

EXPERIMENTAL MYCOLOGY

Yamaguchi M., Shimizu K., Kawamoto S., Stepanova A.A., Vasilyeva N.V. Ultrastructural observation of cell components during budding in yeast *Malassezia pachydermatis* 13

Golubev W.I. Mycocin sensitivity patterns of teleomorphs and Cryptococcus species of the Tremellales order 19

Ananieva E.P., Karavaeva A.V., Solovskij M.V. Antimicrobial activity of polymeric complexes of antibiotic amikacin 22

Ryabinin I.A., Chilina G.A., Bogomolova T.S., Mihaylova J.V. Unusual variants of *Aspergillus* spp. in culture 26

Stepanova A. A., Vasilyeva N. V., Pinegina O. N. Scanning electron microscopy of biofilm on urethral and venous catheters 32

Svistova I.D., Koretskaja I.I. The accumulation of dangerous soil micromycetes to humans in the zone of influence of the highway «Don» 38

Dorshakova E.V., Elinov N.P., Mamoshin A.N. Study of *Stachybotrys* spp. growth on different samples of plant materials . 41

Pinegina O.N., Raush E.R., Vasilyeva N.V. Testing of antifungal susceptibility of *Candida* in biofilms 46



УДК 57.06:616-002.828

НОВОЕ В ТАКСОНОМИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЭНДЕМИЧЕСКИХ МИКОЗОВ (ОБЗОР)

**Липницкий А.В. (г.н.с.)*, Антонов В.А.
(директор института), Маркин А.М. (н.с.)**

Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора,
Волгоград, Россия

© Коллектив авторов, 2014

В обзоре литературы отражены новые данные зарубежных исследователей относительно таксономического положения возбудителей эндемических микозов. На основе результатов молекулярно-генетических исследований выявлены изменения в таксономии этих грибов. Они включают предложения о новых видах и генетических группах. Кроме того, обсуждается проблема изменений в семействе Onygenaceae.

Ключевые слова: бластомикоз, гистоплазмоз, кокцидиоидоз, паракокцидиоидоз, таксономия

NOVATION IN THE TAXONOMY OF CAUSATIVE AGENTS OF ENDEMIC MYCOSES (REVIEW)

**Lipnitsky A.V. (chief scientific officer),
Antonov V.A. (director of the institute),
Markin A.M. (scientific collaborator)**

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd,
Russia

© Collective of authors, 2014

A review of literature highlights current data of worldwide researchers on taxonomic position of causative agents of endemic mycoses. On the basis of the application of molecular-genetic investigations the change of taxonomy of these fungi was revealed. These alterations included the offers concerning the new species and genetic groups. Also the problem of the change in the family Onygenaceae is discussed.

Key words: blastomycosis, coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, taxonomy

Достижения последнего десятилетия в области молекулярной генетики в значительной степени отразились на таксономическом положении медицински значимых грибов, в том числе – возбудителей эндемических (особо опасных) микозов (кокцидиоидоза, гистоплазмоза, паракокцидиоидоза и бластомикоза). Некоторые предложения по изменению их таксономии уже признаны официально, т.е. вошли в Международный Кодекс Ботанической Номенклатуры, другие продолжают обсуждаться и пока не получили общей поддержки микологического сообщества.

Кокцидиоидоз. До начала 21-го столетия официально признанным этиологическим агентом кокцидиоидоза – наиболее опасного из эндемических микозов, являлся *Coccidioides immitis* Rixford et Gilchrist, 1896, единственный представитель рода *Coccidioides*, входящий до настоящего времени, как и все другие возбудители эндемических микозов, в отдел – *Ascomycota*, класс – *Euascomycetes*, порядок – *Onygenales*, семейство – *Onygenaceae*. Однако в середине 90-х годов прошлого столетия с применением новых молекулярно-генетических методов, в частности, анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) для изучения внутривидовых взаимоотношений штаммов *C. immitis*, их подразделили на две группы (Zimmerman C.R. et al., 1994). Позднее были выявлены отличия между штаммами из различных эндемических регионов США (Burt A. et al., 1997) и предложено разделить все изоляты на две генетически и географически обособленные группы – калифорнийскую и некалифорнийскую (Koufopanou V. et al., 1997).

В настоящее время для калифорнийского варианта оставлено прежнее название вида – *C. immitis*, а некалифорнийского – *C. posadasii* (Fisher M.C. et al., 2002) в честь Alechandro Posadas (Посадас), описавшего первый случай кокцидиоидоза у больного из Аргентины. Разделение возбудителей кокцидиоидоза на два вида закреплено в Международном Кодексе Ботанической Номенклатуры и находит подтверждение в многочисленных исследованиях. Так, показано, что генетические рекомбинации между этими двумя видами никогда не происходили, хотя внутри каждого вида они зафиксированы (Fisher M.C. et al., 2000). При изучении генетической вариативности 32 штаммов *Coccidioides* spp., выделенных в Центральной Америке (Мексика, Аргентина), с помощью сиквенирования фрагмента гена Ag2/PRA и оценки маркеров при AFLP-анализе (Amplified Fragment Length Polymorphism) установлено, что все они принадлежат к *C. posadasii*. Фенотипические различия между штаммами, выделенными в разных странах, не обнаружены. Авторы полагают, что этот вид составляет единую генетическую популяцию в Латинской Америке [1].

Недавно был проведен сравнительный полногеномный анализ штаммов – представителей двух ви-

* Контактное лицо: Липницкий Анатолий Васильевич,
тел.: 37-33-65

дов *Coccidioides*, а также генетически близких к ним возбудителя гистоплазмоза и непатогенного гриба *Uncinocarpus reesii*, принадлежащего к роду *Malbranchea*, Saccardo, 1982, и широко распространенного в почве, на гниющей растительности и на помете животных [2]. Несмотря на схожесть в размерах геномов обоих видов *Coccidioides*, они отличались по количеству аннотированных генов (10 355 – у *C. immitis* и 7 299 – у *C. posadasii*). Вместе с тем, на основе использования биохимических и молекулярно-генетических методов было показано, что у *Coccidioides* spp. семейство генов, кодирующее ферменты, обуславливающие деградацию клеточной стенки растений, количественно значительно меньше, чем у непатогенных грибов, разлагающих растения. В то же время, значительно расширено семейство генов протеаз, необходимых для усвоения питательных веществ из клеток млекопитающих. Исследователи предполагают, что патогенный фенотип рода *Coccidioides* является результатом адаптивных изменений в геноме за счет приобретения генов, позволяющих ему расти в средах с имеющимися внутри макроорганизма железом и азотом. В итоге изменился субстрат питания гриба – от растительного к животному.

Пока не ясно, насколько результаты этого глубокого исследования, выполненного группой из 24 ученых, могут изменить систематическое положение *Coccidioides* spp., в частности, повлиять на их перенос в семейство *Ajellomycetaceae*. Ранее, в него уже было предложено включить микромицеты из порядка *Oryngales*, эволюция которых происходила в тесном взаимодействии с позвоночными животными [3]. В настоящее время большинство микологов признают факт апатогенности телеоморф (в отличие от анаморф). Дополнительным аргументом для этого переноса могут служить результаты исследований, в которых показана возможность существования полового процесса у *Coccidioides* spp. [4].

Гистоплазмоз. Этиологическим агентом гистоплазмоза является представитель рода *Histoplasma* – *H. capsulatum*. В настоящее время называют три варианта этого вида, отличающиеся по фенотипическим характеристикам, географическому распространению и способности инфицировать человека и животных [5]. Различия вариантов подтверждены и результатами сиквенирования спейсерных областей генома (ITS1-5.85 рДНК-ITS2) [6, 7]. *H. capsulatum* var. *capsulatum*, Darling, 1906, вызывает заболевания преимущественно на американском континенте; *H. capsulatum* var. *duboisii*, Drouhet, 1957 – эндемичен в некоторых странах Африки и на острове Мадагаскар; *H. capsulatum* var. *farcinosum* – возбудитель эпизоотического лимфангоита лошадей, ослов, мулов, обладает низкой степенью патогенности для человека.

Штаммы *H. capsulatum* var. *capsulatum* из Северной Америки на основе PFLP митохондриальной ДНК были разделены на две группы (Nam Hcc1 и Nam Hcc2) (Spitzer E.D. et al., 1989). Позднее, по

данным мультилокусного сиквенирования, были обнаружены 4 варианта географически разделенных групп, в которые, помимо американских вариантов (Nam Hcc1 и Nam Hcc2), были включены панамские (Panama Hcc) и южно-американские (Sam Hcc) штаммы. В результате исследования более полного набора штаммов признано, что *H. capsulatum* состоит из 8 клад (филогенетических групп), представляющих различные географические регионы мира [6]. Штаммы *H. capsulatum* var. *capsulatum* включены во все группы, а принадлежащие к var. *duboisii* – ограничены только американскими вариантами. Тем не менее, в исследованиях последних лет обнаружили значительные генетические отличия штаммов внутри этих групп. Так, при генетическом анализе 47 штаммов *H. capsulatum* var. *capsulatum*, выделенных от инфицированных летучих мышей, собранных в Мексике, Бразилии и Аргентине, были выявлены 2 больших кластера. Кластер 1 с тремя субклассами (1a, 1b, 1c) включал изоляты из Мексики, причем субкласс 1a состоял только из штаммов, полученных от мигрирующих летучих мышей одного вида. Кластер 2 состоял из образцов, собранных в Бразилии и Аргентине [9]. В другом исследовании с помощью мультилокусного сиквенс-типирования спейсерной области (ITS-2) рДНК одного изолята от кошки было установлено, что выделенный штамм *H. capsulatum*, хотя и близок к североамериканской кладе 1, однако представляет отдельную кладу или филогенетический вид [10].

Из приведенных материалов следует, что таксономическое положение *H. capsulatum* до настоящего времени остается неустойчивым и количество генетически обособленных географических и иных популяций (или филогенетических видов) постоянно изменяется по мере внедрения новых молекулярно-генетических подходов и расширения числа изученных штаммов.

Паракокцидиоидоз. До 2006 г. не вызывало сомнений, что род *Paracoccidioides* включает только один вид – *P. brasiliensis*, (Splendore) Almeida, 1930, являющийся этиологическим агентом паракокцидиоидоза – одного из наиболее распространенных системных микозов в Латинской Америке. Гриб неоднократно выделяли из клинических образцов больных людей, некоторых видов броненосцев и собак, причем одни и те же «экопатогенотипы» могли инфицировать и людей, и других млекопитающих [11, 12]. Однако при использовании генетических методов типирования (мультилокусного сиквенирования и анализа микросателлитов) обнаружили, что генетическая вариабельность, оцениваемая ранее как внутривидовая, в частности, обусловленная полиморфными вариантами генов, ассоциированных с географическим положением, на самом деле, отражает существование четырех неизвестных видов: трех – внутри комплекса *P. brasiliensis* – S1, PS2 и PS3 [13, 14] и нового – *P. lutzii* [15, 16], вначале обозначенного как Pb01-like. S1 – географически наиболее

распространенный вид, встречающийся в Бразилии, Аргентине, Парагвае, Уругвае, Перу и Венесуэле; PS2 выявлен в Венесуэле и Бразилии, совместно с S1, тогда как эндемичность PS3 ограничена Колумбией. *P. lutzii* встречается преимущественно на западе и в центральной части Бразилии [16]. Хотя не существует точных доказательств, являются ли S1, PS2 и PS3 географическими вариантами одного вида [17] или действительно отдельными видами [13, 14], они, как и новый вид *P. lutzii*, репродуктивно изолированы в природе, что доказано с помощью одного из методов филогенетического анализа – Split Decomposition Analysis [13, 16]. По-видимому, имеются морфологические и антигенные различия двух видов. Так, Batista J.J. et al. [18] показали, что при использовании стандартного антигена для диагностики паракокцидиоза (gp43) с сыворотками больных, живущих в географически различных регионах, часто отмечаются ложноотрицательные результаты в иммунодиффузионных тестах, что можно объяснить различной антигенной структурой видов *Paracoccidioides*. По данным Marques-da-Silva S.H., et al. [19], сыворотки двух больных из региона бассейна реки Амазонки, несмотря на тяжелую форму паракокцидиоза, отрицательно реагировали в тестах иммунодиффузии с экзоантигеном из *P. brasiliensis*. Однако при использовании экзоантигена из аутологичного штамма *P. lutzii* были зафиксированы положительные результаты [19]. Авторы подчеркивают также необходимость использования для серологической диагностики различных антигенных препаратов в регионах, где встречаются *P. brasiliensis* S1 и PS2 [20]. Кроме того, изоляты из западно-центральной части Бразилии, принадлежащие теперь к *P. lutzii*, были более чувствительны *in vitro* к триметоприм-сульфаметоксазолу, чем штаммы из других регионов [18].

Наличие удлиненных конидий мицелиальной фазы часто отмечают у штаммов *P. lutzii*, что делает характеристики этих элементов (форма и размер) потенциальными морфологическими маркерами для дифференциации между *P. lutzii* и тремя видами (S1, PS2, PS3) комплекса *P. brasiliensis* [17, 21]. В то же время, при детальном изучении дрожжевых форм 11 штаммов, представляющих все четыре вида *Paracoccidioides*, не был выявлен характерный морфологический профиль любого вида, хотя наблюдали значительные отличия формы и размеров материнских и дочерних (почкующихся) клеток различных штаммов внутри каждого вида [22]. Таким образом, самыми надежными маркерами, позволяющими четко дифференцировать четыре вида рода *Paracoccidioides*, остаются результаты генетического анализа, в частности, исследования единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов интеина (GP43, ARF и PRP8) [17, 23].

Систематическое положение *Paracoccidioides* spp. в составе семейства *Onygenaceae* может измениться в связи с вероятным наличием у этих микромицетов половой формы. Несмотря на известное существова-

ние телеоморф у близкородственных представителей видов *Histoplasma* и *Blastomyces*, до настоящего времени род *Paracoccidioides* считают асексуальным. Однако в недавно опубликованной работе Teixeira M.M., et al. [24] при проведении молекулярно-эволюционных исследований были выявлены рекомбинации внутри изолированных популяций *Paracoccidioides* spp., что служит основой возможного наличия у них полового цикла развития и, как следует ожидать, отсутствия у них половой формы патогенности в отношении представленного царства *Animalia*.

Независимо от этого, наличие тесной эволюционной связи *Paracoccidioides* spp. с животными (по-видимому, с некоторыми видами броненосцев), позволило включить его в уже упомянутое новое семейство *Ajellomycetamyceae* порядка *Onygenales* [3, 25]. Недавно редкий патогенный гриб *Lacazia loboi* (возбудитель лазариоза или болезни Лобо) также отнесен к этому семейству как близкий родственник *Paracoccidioides* [16, 26]. У дельфинов описано и другое лазариозоподобное заболевание, возбудитель которого по результатам сиквенирования рДНК и последующему филогенетическому анализу более близок к *P. brasiliensis*, чем к *L. loboi*, но, возможно, представляет новый вид из порядка *Onygenales* [27].

Бластомикоз. До самого последнего времени неизменным было положение этиологического агента бластомикоза *Blastomyces dermatitidis* Gilchrist et Stokes, 1898, как единственного представителя рода *Blastomyces*. Ранее, при использовании современных молекулярно-генетических методов внутривидового типирования, штаммы гриба, выделенные в различных географических регионах, были разделены на три генетические группы (А, В и С). Однако, по мнению авторов, эти группы, отличающиеся по типу скрещивания, адаптации к различным экологическим нишам и, возможно, по вирулентности представляли варианты одного вида (McCullough M.J., et al., 2000). Значительно позднее Meese J.K. et al [28], используя панель из 112 изолятов, с помощью микросателлитного типирования показали, что все изоляты *B. dermatitidis* могут быть разделены на 5 генетических групп, причем более 95% представляли группы А и В, определенные в предыдущей работе. Лишь в 2013 г. Brown E.M., et al. [29] предложили разделить возбудителя бластомикоза на две самостоятельные таксономические единицы. Помимо прежнего *B. dermatitidis*, новым видом стал *B. gilchristii*. Свое название он получил в честь Томаса Каспера Джилкрайста (Gilchrist), описавшего первый случай бластомикоза (прежнее название – североамериканский бластомикоз) в Балтиморе в 1894 г. и впервые получившего культуру гриба в 1898 г. вместе со Стоксом (Stoks). В таксономической характеристике нового вида указано, что он может быть дифференцирован от *B. dermatitidis* по позиции нуклеотидов генов: хитинсинтазы, гистидинкиназы, оротидин 5'-фосфат декарбоксилазы и внутреннего транскрибируемого

спейсера 2 рДНК. Два вида различаются между собой «генным потоком» и отсутствием рекомбинации между видами, но не внутри их. Предполагают, что наличие естественных резервуаров каждого вида обусловлено их географическим разделением, связанным со специфическими микроэкологическими факторами. Не исключено, что *B. gilchristii* адаптировался к микроишам гиперэндемических районов северо-запада Онтарио, Висконсина и Миннесоты, тогда как *B. dermatitidis* способен к выживанию при более широком спектре экологических условий, характерных для всей Северной Америки [29]. Эта гипотеза хорошо согласуется с описанием вирулентности и фенотипическими особенностями каждого вида. При сравнительном исследовании изолят *B. gilchristii* был высоковирулентным, тогда как два штамма *B. dermatitidis* оказались неспособными вызвать гибель мышей. У отдельных штаммов этих двух видов были выявлены и некоторые различия в росте на питательных средах. Возможно, что вариации клинических симптомов и исхода заболевания, наблюдаемые при бластомикозе [30-32], обусловлены не только штаммовыми, как предполагали ранее, но и видовыми отличиями. Так, при использовании микросателлитного анализа для генотипирования 227 штаммов гриба, выделенных от больных в Висконсине, они были разделены на две группы. Штаммы группы 1 обуславливали развитие легочной инфекции, тогда как изоляты группы 2 чаще всего вызывали диссеминированную форму бластомикоза у пожилых людей, имеющих сопутствующие хронические заболевания [33]. Высокий уровень заболеваемости на северо-западе Онтарио и Висконсине может быть объяснен недавним появлением более вирулентного вида – *B. gilchristii* (BS2). Адаптация к новым локальным условиям могла привести к генетической несовместимости между видами, даже, несмотря на перекрывание зон их географического распределения [32].

Следует отметить корреляцию между предложенными видами *Blastomyces* и генетическими группами, идентифицированными ранее с помощью RFLP. При этом штаммы генотипической группы А соответствовали *B. gilchristii* [29] как по географическому районированию, так и по отсутствию генетических

вариаций в сравнении с другими группами. Предполагают также, что вид *B. gilchristii* соответствует группе А, идентифицированной с помощью мультилокусного микросателлитного анализа [28].

В ряде исследований прошлых лет были обнаружены значительные различия между североамериканскими (серотип 1) и африканскими (серотип 2) штаммами *B. dermatitidis* по морфологии, характеру конверсии мицелиальной фазы в дрожжевую, серологическим свойствам и клиническими проявлениями вызываемых ими заболеваний (Sudman M.S., Kaplan W., 1974; Carman W. et al., 1989; Klein B.S. et al., 1997; Brandhorst T.T. et al., 2002). Более того, по результатам сиквенирования 26S рРНК и анализа кривых плавления, ДНК штаммы африканского серотипа оказались более тесно связанными с *Emmonsia* spp., чем с североамериканским серотипом (Gueho E. et al., 1997). Заключение о принадлежности африканских штаммов *B. dermatitidis* к самостоятельному виду было основано как на молекулярно-генетических, так и морфологических исследованиях (Mercantini R. et al., 1995; Gueho E. et al., 1997). Однако, по данным Brown E.M., et al [29], исследованные ими 6 африканских штаммов представляли из себя филогенетические типы внутри серотипа 1 *B. dermatitidis*. По-видимому, вопрос о таксономической принадлежности африканских штаммов *Blastomyces* требует дальнейшего изучения на более репрезентативной коллекции изолятов.

По данным анализа публикаций последних лет, касающихся таксономии возбудителей эндемических микозов, можно судить о неоднозначности результатов многих исследований, в том числе связанных с предложениями о включении в число этиологических агентов паракокцидиоидоза и бластомикоза новых видов. По-видимому, необходима разработка единой схемы таких исследований с конкретными рекомендациями по использованию тех или иных молекулярно-генетических и других методов в целях таксономии грибов. Тем не менее, следует помнить тот признанный факт, что патогенными являются лишь анаморфные штаммы грибов, но не телеоморфные.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Duarte-Escalante E., Zúñiga G., Frías-De-León M.G., et al. AFLP analysis reveals high genetic diversity but low population structure in *Coccidioides posadasii* isolates from Mexico and Argentina // BMC Infect Dis. – 2013. – Vol. 13. – P. 411.
2. Sharpton T.J., Stajich J.E., Rounsley S.D., et al. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives // Genome Res. – 2009. – Vol. 19, №10. – P. 1722-1731.
3. Untereiner W.A., Scott J.A., Naveau F.A., et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate – associated Onygenales // Mycologia. – 2004. – Vol. 96 – P. 812-821.
4. Mandel M.A., Barker B.M., Kroken S., et al. Genomic and population analyses of the mating type loci in *Coccidioides* species reveal evidence for sexual reproduction and gene acquisition // Eukaryot. Cell. – 2007. – Vol. 6 – P. 1189-1199.
5. Heitman J., Filler S.G., Edwards J.E. Molecular principles of fungal pathogenesis // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12, №10. – P. 321-331.
6. Kasuga T., White T.J., Koenig G., et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum* // Molec. Ecology. – 2003. – Vol. 12. – P. 3388-3401.
7. Brilhante R.S., Ribeiro J.F., Lima R.A., et al. Evaluation of the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* isolates from north-eastern Brazil // J. Med. Microbiol. – 2012. – Vol. 61, pt.12. – P. 1688-1695.
8. Murata Y., Sano A., Ueda Y., et al. Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan // Med. Mycol. – 2007. – Vol.

- 45, №3. – P. 233-247.
9. Taylor M.L., Hernández-García L., Estrada-Bárceñas D., et al. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil, and Argentina, using the polymorphism of (GA)_n microsatellite and its flanking regions// Fungal. Biol. – 2012. – Vol. 166, №2. – P. 308-317.
 10. Balajee A.S., Hurst S.F., Chang L.S., et al. Multilocus sequence typing of *Histoplasma capsulatum* in formalin – fixed paraffin – embedded tissues from cats living in non-endemic regions reveals a new phylogenetic clade// Med. Mycol. – 2012. – Vol. 51, №4. – P. 345-351.
 11. Corredor G.G., Peralta L.A., Castaño J.H., et al. The naked – tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate// Med. Mycol. – 2005. – Vol. 43, №3. – P. 275-280.
 12. Farias M.R., Condas L.A., Ribeiro M.G., et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly// Mycopathologia. – 2011. – Vol. 172. – P. 147-152.
 13. Matute D.R., McEwen J.G., Puccia R., et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies// Mol. Biol. Evol. – 2006. – Vol. 23. – P. 65-73.
 14. Matute D.R., Sepulveda V.E., Quesada L.M., et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis* // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44 – P. 2153-2157.
 15. Carrero L.L., Niño-Vega G., Teixeira M.M., et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen // Fungal Genet. Biol. – 2008. – Vol. 45, №5. – P. 605- 612.
 16. Teixeira M.M., Theodoro R.C., Carvalho M.J., et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus// Mol. Phylogen. Evol. – 2009.– Vol. 52. – P. 273-283.
 17. Salgado-Salazar C., Jones L.R., Restrepo Á., et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers// Cladistics. – 2010. – Vol. 26. – P. 1-12.
 18. Batista J. Jr., Camargo Z.P., Fernandes G.F., et al. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? // Mycoses. – 2008. – Vol. 53. – P. 176-180.
 19. Marques-da-Silva S.H., Rodrigues A.M., Hoog G.S., et al. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases// Amer. J. Trop. Meg. Hyg. – 2012. – Vol. 87, №4. – P. 710-714.
 20. Machado G.C., Moris D.V., Arantes T.D., et al. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis// Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2013. – Vol. 108, №5. – P. 637- 643.
 21. Bocca A.L., Amaral A.C., Teixeira M.M., et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues// Future Microbiol. – 2013. – Vol. 8, №9. – P. 1177-1191.
 22. Menino J.E., Osório N.S., Sturme M.H., et al. Morphological heterogeneity of *Paracoccidioides brasiliensis*: relevance of the Rho-like GTPase PbCDC42// Med. Mycol. – 2013. – Vol. 50, №7 – P. 768-774.
 23. Theodoro R.C., Teixeira M., Felipe M.S., et al. Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects// PLoS ONE. – 2012. – Vol. 75, №5 – P. 1-15.
 24. Teixeira M.M., Theodoro R.C., Derengowski S., et al. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*// Eucariot. Cell. – 2012. – Vol. 12, №3. – P. 380-389.
 25. Bagagli E., Bosco S.M., Theodoro R.C., et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen// Infect. Genet. Evol. – 2006. – Vol. 6. – P. 344-351.
 26. Vilela R., Rosa P.S., Belone A.F., et al. Molecular phylogeny of animal pathogen *Lacazia loboi* inferred from rDNA and DNA coding sequences// Mycol. Res. – 2009. – Vol. 113. – P. 851-857.
 27. Esperón F., García-Párraga D., Bellière E.N., et al. Molecular diagnosis of lobomycosis – like disease in a bottlenose dolphin in captivity// Med. Mycol. – 2012. – Vol. 50, №1. – P. 106-109.
 28. Meece J.K., Anderson J.L., Fisher M.C., et al. Population genetic structure of clinical and environmental isolates of *Blastomyces dermatitidis*, based on 27 polymorphic microsatellite markers// Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77 – P. 5123-5131.
 29. Brown E.M., McTaggart L.R., Zhang S.X., et al. Phylogenetic analysis reveals a cryptic species *Blastomyces gilchristii*, sp. nov. within the human pathogenic fungus *Blastomyces dermatitidis*// PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, №3 – P. 1-14.
 30. Kralt D., Light B., Cheang M., et al. Clinical characteristics and outcomes in patients with pulmonary blastomycosis// Mycopathologia – 2009. – Vol. 167. – P. 115-124.
 31. Saccente M., Woods G.L. Clinical and laboratory update on blastomycosis// Clin. Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. 23 – P. 367-381.
 32. Tibayrenc M. Genetics and Evolution of Infectious Diseases// 1st Ed., Species and Speciation in pathogenic fungi. – 2010. – P. 4-8.
 33. Meece J.K., Anderson J.L., Gruszka S., et al. Variation in clinical phenotype of human infection among genetic groups of *Blastomyces dermatitidis* // Y. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 207, №5. – P. 814-822.

Поступила в редакцию журнала 14.05.2014

Рецензенты: А.Е. Тараскина



КИШЕЧНЫЙ БИОТОП У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЛЕГКОГО, ПОЛУЧАЮЩИХ ХИМИОТЕРАПИЮ

¹Серкова М.Ю. (аспирант), ¹Ткаченко Е.И. (зав. кафедрой), ¹Авалуева Е.Б.* (профессор кафедры), ²Орлов С.В. (зав. лаб.), ¹Иванов С.В. (ассистент кафедры), ¹Шевяков М.А. (профессор кафедры)

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России (кафедра пропедевтики внутренних болезней и кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии); ²НИИ пульмонологии I Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2014

В статье представлено описание кишечного биотопа у пациентов с раком легкого на фоне химиотерапии. Состояние кишечного микробиоценоза оценивали микробиологическим методом, а также путем определения концентрации метаболитов микроорганизмов в крови методом газожидкостной хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МСМ) по методике Осипова Г.А. Провели оценку основных клинических проявлений гастроинтестинальной токсичности химиотерапии, ассоциированных с дисбиотическими изменениями. В результате исследования выявили снижение облигатной микробиоты и скудность микробного представительства в кишечнике у данной категории пациентов на фоне превалирования обстипационного синдрома в структуре гастроинтестинальных жалоб. В дальнейшем больным рекомендовано применение пробиотической терапии для профилактики и коррекции данных изменений.

Ключевые слова: кишечная микробиота, масс-спектрометрия микробных маркеров, рак легкого, химиотерапия

INTESTINAL BIOTOP AT PATIENTS WITH LUNG CANCER RECEIVING CHEMOTHERAPY

¹Serkova M.Yu. (postgraduate student), ¹Tkachenko E.I. (head of the chair), ¹Avalueva E.B. (professor of the chair), ²Orlov S.V. (head of the laboratory), ¹Ivanov S.V. (assistant of the chair), ¹Shevyakov M.A. (professor of the chair)

* Контактное лицо: Авалуева Елена Борисовна
Тел.: (812) 543-93-18

¹ North-Western Medical University named after I.I. Mechnikov (chair of propaedeutics of internal diseases and chair of clinical mycology, allergology and immunology); ²Scientific Research Institute of pulmonology of I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2014

Description of the intestinal microbiota in patients with lung cancer during chemotherapy has been presented in the article. The condition of the intestinal microbiocenosis evaluated by microbiological method and by determining of the concentrations of microorganisms metabolites in blood by gas chromatography - mass spectrometry method. We evaluated the major clinical manifestations of gastrointestinal toxicity of chemotherapy associated with dysbiotic changes. Reduction of obligate microbiota and the poor of microbial representation in the intestine in this category of patients on the background of the prevailing obstipation syndrome in the structure of gastrointestinal complaints have been revealed. Further patients recommended the use of probiotic therapy for the prevention and correction of these changes.

Key words: chemotherapy, gas-liquid chromatography – mass spectrometry, intestinal dysbiosis, intestinal microbiota, lung cancer, microbial markers

ВВЕДЕНИЕ

Цитостатические препараты – агрессивные факторы, способные вызывать не только нарушения состава микробиоты организма, но и изменения свойств её отдельных представителей. Неблагоприятный характер воздействия этих препаратов является комплексным и может реализовываться как путем прямого воздействия на микробиоту, так и опосредованно через макроорганизм и микроэкологические взаимоотношения. Биологические характеристики бактерий, выделенных на фоне введения химиотерапевтических лекарственных средств, отличаются от аналогичных свойств бактерий, встречающихся у людей или лабораторных животных, не подвергавшихся воздействию препаратов с цитотоксическими свойствами [1]. В исследованиях [2, 3] показано, что на фоне химиотерапии уменьшается разнообразие микробного сообщества, в целом, и снижается количество анаэробных бактерий в кишечнике, в частности. Michel J. Van Vliet с соавторами предполагают, что кишечная микробиота может играть основную роль в развитии воспаления слизистой оболочки гастроинтестинального тракта, обусловленного химиотерапией. По мере того, как вследствие воздействия химиопрепаратов на гомеостаз кишечных микробов повреждается кишечная микробиота, уровень защиты энтероцитов снижается. Некоторые микроорганизмы могут способствовать образованию активных токсических метаболитов химиотерапевтических препаратов, которые приводят к прогрессированию воспалительного процесса [4, 3]. В клинических ситуациях прогнозирование эффектов цитостатиков в отношении микроорганизмов может быть затруднено множественностью факторов, воздействующих на организм пациента, различиями в направленности влияния одних и тех же препаратов на микроорганизмы в зависимости от конкретных условий. Исходя из этого, необходимо максимально широко использовать меры по микробиологическому мони-

торингу у пациентов, получающих химиотерапевтические препараты, с целью выявления и коррекции микрoэкологических нарушений, а также выбора рациональной антибактериальной терапии в случае развития инфекционных осложнений на фоне иммуносупрессии, вызываемой цитостатиками [1]. Таким образом, еще до начала лечения цитостатиками нужно учитывать микрoэкологические изменения в толстой кишке и выполнять превентивную коррекцию возможного повреждения желудочно-кишечного тракта, особенно у лиц, имеющих патологические изменения в гастроинтестинальном тракте еще в период постановки диагноза онкологического заболевания [5].

В связи с этим мы провели исследование, в результате которого определяли качественный и количественный состав внутриполостной и пристеночной микробиоты кишечника пациентов с раком легкого, получающих химиотерапию.

Цель исследования – изучить характер изменений микробоценоза кишечника и проанализировать связь между дисбиотическими изменениями и гастроинтестинальными жалобами у пациентов с раком легкого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились пациенты, получавшие первый цикл первой линии химиотерапии по поводу рака легкого, в возрасте от 49 до 73 лет и средней продолжительностью онкологического заболевания – 12 месяцев. Все больные на момент включения в исследование получали курс химиотерапии, состоящий из препаратов платины, антагонистов фолиевой кислоты, таксанов растительного происхождения и преднизолона в обычных дозах.

42 пациентам провели микробиологическое исследование фекалий [6], 29 – исследование метаболитов микроорганизмов в крови с помощью метода ГХ-МСМ [7]. Клинические проявления гастроинтестинальной токсичности химиотерапевтических препаратов оценивали с применением стандартизованного респонса для выявления гастроинтестинальных жалоб (анкетированы 94 человека).

Данные обрабатывали статистически с помощью программы «SPSS Statistics 17.0» (компания «SPSS Inc.», США) [8-10]. Для расчета доверительных интервалов использовали метод Уилсона, для анализа корреляционных связей – коэффициент корреляции Спирмена, для анализа взаимосвязей между количественными значениями различных представителей кишечной микробиоты – факторный анализ (метод главных компонент, метод вращения – варимакс). Проведение исследования было одобрено Локальным этическим комитетом СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественный и количественный состав микробиоты кишечника определяли микробиологическим

методом у 42 больных, получавших химиотерапию. Частота регистрации измененных и соответствующих референтным значениям показателей кишечной микробиоты у пациентов с раком легкого представлена на рисунке 1.

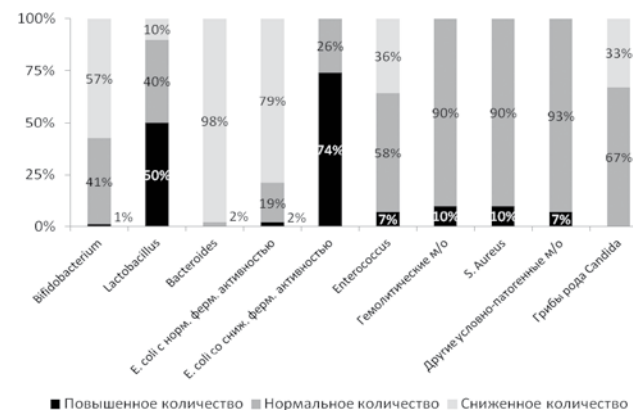


Рис. 1. Частота регистрации измененного и неизменного количества основных представителей микробоценоза кишечника у пациентов с раком легкого после курса химиотерапии по результатам микробиологического метода. По оси абсцисс – представители кишечного микробоценоза, по оси ординат – частота, %

По результатам микробиологического метода, количество бифидобактерий было ниже референтных значений у 24 (57%) больных, количество бактероидов – у 41 (98%). Количество лактобактерий было снижено у 14 (10%) человек, а у 21 (50%), напротив, оказалось повышенным. Изменения в качественном составе кишечной палочки имели место преимущественно за счет снижения количества кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью: показатели были ниже референтных значений у 33 (79%) пациентов. При этом рост кишечной палочки со сниженной ферментативной активностью, напротив, превышал референтные значения у 31 (74%) больного с раком легкого. Содержание в кале *Candida* spp., по сравнению с референтными значениями, было превышено у 14 (33%) обследованных лиц.

На основании результатов исследования рассчитали ожидаемые частоты распространенности дисбиотических изменений микробоценоза кишечника в генеральной совокупности пациентов с раком легкого после курса химиотерапии. По данным микробиологического метода, наиболее часто у этой категории больных должны быть обнаружены: снижение количества бактероидов – у 88-100% пациентов, бифидобактерий – у 42-71%, кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью – у 64-88%; увеличение количества кишечной палочки со сниженной ферментативной активностью – у 59-85%, грибов рода *Candida* – у 21-48%.

Исследование метаболитов микроорганизмов в крови с помощью метода ГХ-МСМ провели у 29 больных с раком легкого, получавших химиотерапию. Были определены концентрации метаболитов (или других маркеров) широкого спектра микроорганизмов, общая микробная нагрузка и уровень

эндотоксинов (липополисахаридов) в плазме крови. Частота регистрации измененных уровней микробных метаболитов основных микроорганизмов у пациентов с раком легкого на фоне химиотерапии приведена на рисунке 2.

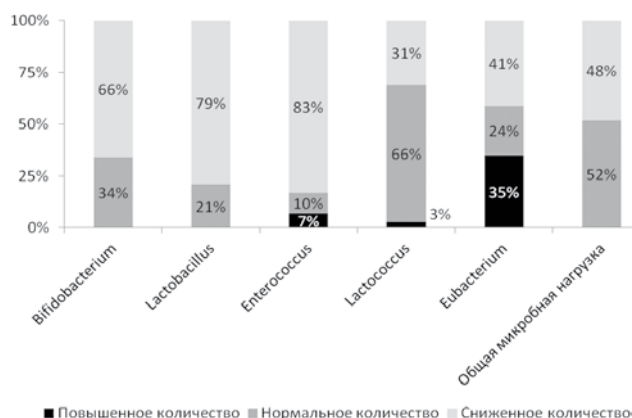


Рис. 2. Частота регистрации измененного и неизменного количества основных представителей микробиоценоза кишечника у пациентов с раком легкого после курса химиотерапии по результатам метода ГХ-МСМ. По оси абсцисс – представители кишечного микробиоценоза и общая микробная нагрузка, по оси ординат – частота, %

При определении концентрации микробных маркеров у включенных в исследование пациентов с раком легкого клинически значимое снижение уровня метаболитов бифидобактерий обнаружили у 19 (65,5%), а клинически значимое снижение уровня метаболитов лактобактерий – у 23 (79,3%). Общая микробная нагрузка была снижена у 14 (48,3%) человек. При оценке уровня метаболитов различных групп микроорганизмов выявили низкий уровень метаболитов – маркеров микробиоты кишечника. Снижение уровня метаболитов *Streptococcus spp.* наблюдали у 20 (69%) больных, *Clostridium histolyticum* – у 24 (82,8%), *Lactococcus* – у 9 (31,0%), *Clostridium propionicum* – у 27 (93,2%), *Actinomyces* – у 22 (73%), *Pseudonocardia* – у 26 (87%), *Clostridium ramosum* – у 13 (43%), *Alcaligenes* – у 6 (20,7%), *Staphylococcus intermedius* – у 13 (44,8%), *Staphylococcus* – у 13 (44,8%), *Eubacterium* – у 12 (41,4%), *Enterococcus* – у 24 (82,8%). При этом отмечали появление в крови метаболитов патогенных микроорганизмов, уровень которых не должен превышать нулевое значение, в том числе: *Peptostreptococcus anaerobius* – у 26 (89,7%) пациентов, *Pseudomonas aeruginosa* – у 7 (24,1%), *Fusobacterium / Haemophilus* – у 19 (65,5%), *Clostridium perfringens* – у 16 (65,2%), *Moraxella / Acinetobacter* – у 7 (24,1%), *Bacteroides fragilis* – у 13 (44,8%). Общее снижение метаболической активности микроорганизмов было подтверждено снижением общей микробной нагрузки у значительной части больных с раком легкого.

Поскольку микробиологический метод дает представление о качественном и количественном составе микробиоты кишечника на основании ее представительства в образцах стула пациентов, а метод масс-спектрометрии микробных маркеров – возможность оценить уровень метаболитов, провели сравнение

результатов этих методов.

Корреляции между значениями основных представителей микробиоты кишечника представлены в таблице.

Таблица

Корреляции между количественными значениями показателей, характеризующих основных представителей микробиоты кишечника, полученных при использовании методов микробиологического и масс-спектрометрии микробных маркеров

Представитель микробиоты кишечника	Значение коэффициента корреляции Спирмена, ρ , n=29	Значение коэффициента детерминации, ρ^2	Уровень значимости, p
<i>Bifidobacterium</i>	0,108	0,01	0,578
<i>Lactobacillus</i>	0,470	0,22	0,010
<i>Enterococcus</i>	0,040	0,00	0,845

Как видно из представленных данных, корреляционных связей между результатами количественного определения бифидобактерий и энтерококков при использовании двух сравниваемых методов не отмечали, но обнаружили статистически значимую корреляционную связь средней силы ($\rho=0,470$) между результатами определения лактобактерий. Выявили, что по результатам метода масс-спектрометрии микробных маркеров уровень метаболитов лактобактерий был снижен у 79,3% больных, а по результатам микробиологического метода их количество было повышено у 50,0%, что позволяет сделать заключение о снижении метаболической активности лактобактерий у пациентов с раком легкого, получающих иммуносупрессивную терапию.

Для анализа взаимосвязей между количественными значениями различных представителей кишечной микробиоты использовали факторный анализ – изучали значения концентраций микробных метаболитов, полученных в результате использования метода масс-спектрометрии микробных маркеров (обследованы 29 пациентов с раком легкого). Выбор именно факторного анализа для обнаружения связей между количественными значениями различных показателей кишечного микробиоценоза обусловлен тем, что он способствует не только выявлению парных корреляций между отдельными представителями микробиоты кишечника, но и возможности их группировки на основании выявленных корреляционных связей. В результате данного анализа установлены группы представителей кишечной микробиоты, демонстрировавшие сходную направленность изменения количественного состава (снижение или увеличение). При факторном анализе выделены пять ассоциаций микроорганизмов, внутри которых количество метаболитов – маркеров микроорганизмов изменялось сходным образом (т.е. имелись прямые корреляционные связи):

Lactobacillus, *Clostridium ramosum*, *Actinomyces*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Nocardia asteroides*, *Corynebacterium CDC-group XX*, *Staphylococcus intermedius*, *Mycobacterium/Candida*.

Bifidobacterium, *Propionibacterium spp.* (*P. freud-*

enreichii), *Eubacterium/ Clostridium coccoides*, *Staphylococcus*, *Clostridium difficile*, *Alcaligenes*, *Acinomyces viscosus*.

Eubacterium, *Prevotella*, *Clostridium perfringens*, *Herpes*, микроскопические грибы (метаболит – ситостерол).

Eubacterium lentum (группа А), *Clostridium coccoides*, микроскопические грибы (метаболит – кампестерол).

Lactococcus, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptomyces*, *Streptococcus / Ruminococcus*.

Отметим, что полученные микробные ассоциации состояли как из облигатных представителей нормальной микрофлоры кишечника, так и условно-патогенных микроорганизмов.

Клинически важным является не только выявление нарушений микроэкологического баланса на фоне химиотерапии, но и оценка клинических проявлений гастроинтестинальной токсичности, которые усугубляются развивающимися дисбиотическими изменениями.

С помощью стандартизированного вопросника провели анкетирование 94 пациентов с раком легкого, которое выполняли дважды – до начала и после окончания курса химиотерапии. Динамика частоты гастроинтестинальных жалоб после курса химиотерапии представлена на рисунке 3.

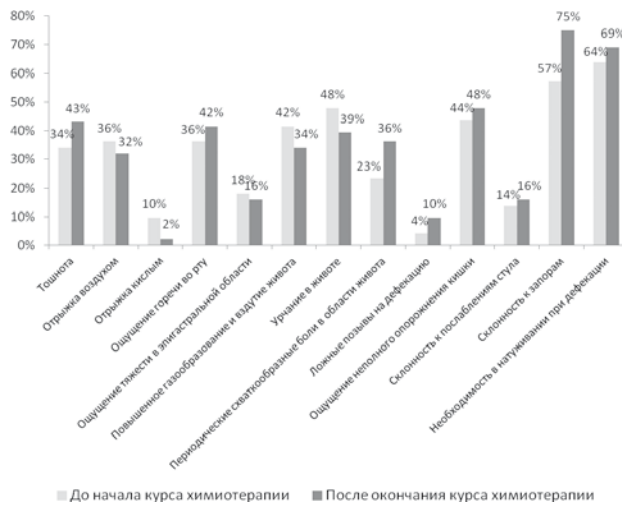


Рис. 3. Частота гастроинтестинальных жалоб у пациентов с раком легкого до и после курса химиотерапии. По оси абсцисс – частота (%), по оси ординат – симптом

При анализе данных из вопросника обнаружили, что у пациентов с раком легкого до начала проведения иммуносупрессивной терапии в структуре выявленных гастроинтестинальных жалоб преобладали явления кишечной диспепсии. При этом наибольшее значение имело нарушение регулярности акта дефекации, выразившееся преимущественно склонностью к запорам, выявленное у 54 (57,5%) пациентов, причем преобладали варианты 2 и 3 типов стула по бристольской шкале формы стула. 60 (63,8%) больных также предъявляли жалобы на необходимость натуживания при дефекации, 45 (47,9%) – отмечали частое урчание в животе. Повышенное газообразова-

ние и вздутие живота беспокоили 39 (41,5%) человек. Среди жалоб со стороны верхних отделов ЖКТ преобладали: тошнота – у 32 (34,0%) пациентов, отрыжка воздухом – у 34 (36,2%), ощущение горечи во рту – у 34 (36,2%). При повторном анкетировании пациентов с раком легкого установили, что непосредственно после курса химиотерапии возросла частота регистрируемых жалоб, связанных с проявлениями гастроинтестинальной токсичности: преимущественно запоров (повышение частоты на 18%), болей в животе (повышение на 13%), тошноты (повышение на 9%); при этом частота встречаемости общих жалоб не претерпела значительных изменений.

Наиболее значимым, с клинической точки зрения, было увеличение частоты встречаемости запоров у пациентов с раком легкого после химиотерапии, которая возросла с 57,5% (95% ДИ 47,4-67,0%) до 75,5% (95% ДИ: 66,0-83,1%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования получены представления о кишечном биоценозе пациентов с раком легкого, получавших иммуносупрессивную терапию. По данным микробиологического метода оценки состояния кишечного биоценоза, у этой категории больных выявили скудный рост облигатных микроорганизмов в фекалиях и следующие дисбиотические изменения: уменьшение количества бифидобактерий на фоне патологического увеличения количества лактобактерий; практически полное отсутствие бактероидов; уменьшение количества энтерококков и кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью; увеличение количества кишечной палочки со сниженной ферментативной активностью и *Candida spp.*; присутствие условно-патогенных и гемолитических микроорганизмов, *S. aureus*. При анализе метаболического спектра микроорганизмов в крови обнаружили скудность общего микробного представительства и метаболической активности микроорганизмов в ЖКТ, на фоне которой наблюдали повышение количества условно-патогенных микроорганизмов.

Отметим, что отсутствие статистически значимых корреляционных связей между результатами двух использованных в исследовании методов подтверждает тот факт, что с помощью метода масс-спектрометрии микробных маркеров можно оценить количественные показатели и внутриполостной, и пристеночной микрофлоры кишечника, а микробиологическим методом – только внутриполостной. Прямую корреляционную взаимосвязь обнаружили только в отношении количества лактобактерий, но, даже при наличии статистической значимости данной взаимосвязи, результатами одного метода можно объяснить только 22% варибельности результатов другого, что не определяет клинически значимое соответствие полученных значений и подтверждает различия в областях кишечного биоценоза (внутриполостная и пристеночная микрофлора), позволяющих

оценить каждый из методов.

При анализе концентраций метаболитов микроорганизмов у пациентов с раком легкого, получавших иммуносупрессивную терапию, выявили aberrantную связь между количественными показателями основных представителей кишечного микробиоценоза (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) и условно-патогенными микроорганизмами: увеличение или снижение количества метаболитов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ассоциировано с аналогичным и однонаправленным изменением количества представителей условно-патогенной микробиоты.

На фоне иммуносупрессивной терапии у больных с раком легкого отмечали клинические проявления гастроинтестинальной токсичности, в первую очередь, усиление жалоб, связанных с развитием и утяжелением обстипационного синдрома и изменением характера стула. Нарушение микроэкологического

баланса и повреждение кишечного биотопа, наблюдавшиеся у данной категории пациентов, получавших цитостатическую терапию, несомненно, играют большую роль в развитии и усугублении гастроинтестинальных проявлений основного заболевания. Возникновение таких очагов контаминации кишечника оппортунистическими бактериями и микромицетами, по-видимому, может повысить риск бактериального сепсиса и инвазивного кандидоза.

В связи с вышесказанным, актуальна коррекция микробиоты пациентов путем включения в схемы лечения препаратов пробиотического ряда, особенно – до начала иммуносупрессивной терапии. Известно, что лекарственная иммуносупрессия может привести к иммунокомпрометированности пациента, что сделает применение биопрепаратов на основе живых микроорганизмов крайне рискованным [11].

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Шитов А.Н. Влияние цитостатиков на биологические свойства условно-патогенных бактерий микрофлоры кишечника в эксперименте: Автореф. дисс... к.б.н. – М., 2010. – 166 с.
2. Bosscher D., et al. Microbiota and colonic cancer effects // J. of Physiology and Pharmacology. – 2009. – Vol. 60, Suppl. 6. – P. 9-13.
3. van Vliet M.J., Harmsen H.J.M. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis // J. PLoSPathog. – 2010. – Vol. 6. – P. 1045-1060.
4. Kinross J., von Roon A.C., Penney N., et al. The gut microbiota as a target for improved surgical outcome and improved patient care // Curr. Pharm. Des. – 2009. – №15 (13). – P. 1537-1545.
5. Ефремова Н.В., Солдатова Г.С., Виноградов С.П., Бурундукова М.В. Клиническая и микробиологическая характеристики поражения толстой кишки у больных лимфомами в ранний и отдаленный периоды клинико-гематологической ремиссии // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Т. 31, №2. – С. 41-47.
6. ОСТ 91500. 11. 004-2003 (приложение). Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Утвержден приказом Минздрава РФ от 9 июня 2003. – №231. – 82 с.
7. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. Химический анализ в медицинской диагностике. – М.: Наука. – 2010. – С. 293-368.
8. Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей // Экология человека. – 2008. – №5. – С. 56-70.
9. Наследов А. SPSS 19: профессиональный статистический анализ данных. – СПб.: Питер, 2011. – 400 с.
10. Бююль А., Цёфель П. SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. Пер. с нем. – СПб.: ООО «ДиаСофтЮП», 2005 – 608 с.
11. Климко Н.Н. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии / В кн. «Послеоперационные инфекционные осложнения: диагностика, лечение, профилактика». Практическое руководство / Под ред. Н.В.Дмитриевой, И.Н.Петуховой. – М.: Практическая медицина, 2013. – 422 с.

Поступила в редакцию журнала 20.10.2014

Рецензент: В.Г. Радченко



ULTRASTRUCTURAL OBSERVATION OF CELL COMPONENTS DURING BUDDING IN YEAST *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

¹Yamaguchi M. (associate professor), ¹Shimizu K. (assistant professor), ¹Kawamoto S. (professor), ²Stepanova A.A.* (head of the laboratory), ²Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair)

¹ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan; ² North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2014

The phase contrast, scanning and transmission electron microscopy were used for observation of the cell components in exponential phase of growth in M. pachydermatis. Lower level of vacuolization, small number of mitochondria, presence of single cisterns of endoplasmic reticulum (ER), absence of secretory vesicles and presence of large lipid inclusion opposite budding scar was typical for mother cells. It was revealed the uniformity in bud formation: the number of mitochondria, storage inclusion, and cisterns of ER were not increased compared with cytosol volume and number of free ribosomes. The increase in nucleus sizes and level of chromatinisation were observed in mother cell before budding. The mother cell after septum formation, differs from daughter cell in larger volume of cytosol and presence of thicker cell wall. In contrast, for daughter cell was typical in smaller volume of cytosol and presence of large lipid inclusion. A diagram of organelles transition in M. pachydermatis bud-ding was represented.

Key words: budding, exponential phase of growth, freeze-substitution, *Malassezia pachydermatis*, *in vitro*, scanning and transmission electron microscopy, ultrastructure

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ХОДЕ ПОЧКОВАНИЯ *MALASSEZIA PACHYDERMATIS*

¹ Ямагучи М. (адъюнкт-профессор), ¹ Шимицу К. (ассистент профессора), ¹ Кавамото С. (профессор), ² Степанова А.А. (зав. лаб.), ² Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой)

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, тел.: (812) 303-51-40

¹ Центр исследований по медицинской микологии, Университет г. Чива, Япония; ² Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2014

Для изучения перемещения клеточных компонентов в экспоненциальной стадии роста у M. pachydermatis использовали методы фазового контраста, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. Для материнской клетки был характерен низкий уровень вакуолизации, небольшое число митохондрий, присутствие одиночных цистерн эндоплазматического ретикулума (ЭР), обилие секреторных пузырьков и присутствие крупного липидного включения напротив рубчика. Выявили единообразие в формировании почки: число митохондрий, запасных включений и цистерн ЭР не увеличивалось по сравнению с объемом цитозоля и числом свободных рибосом. В материнской клетке до начала почкования наблюдали увеличение размеров ядра и уровня его хроматизации. Материнская клетка после формирования септы отличалась от дочерней большим объемом цитозоля и присутствием толстой клеточной стенки. Напротив, для дочерней клетки был типичен меньший объем цитозоля и присутствие крупного липидного включения. Представлена схема, иллюстрирующая перемещение органелл в ходе почкования M. pachydermatis.

Ключевые слова: замораживание-замещение, *Malassezia pachydermatis*, почкование, сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, *in vitro*, ультраструктура, экспоненциальная фаза роста

INTRODUCTION

Malassezia pachydermatis is basidiomycetous, non obligatory lipophilic, skin normal biota yeast of other warm-blooded animals [1 and Marcon M.J., Powell D.A. // Clin. Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 5; Guého E., et al. // Med Mycol. – 1998. – Vol. 36]. Only these species are zoophilic among members of *Malassezia* genus. It was the part of the normal cutaneous microbiota of dogs [Bond R., et al. // J. Small Anim. Pract. – 1996. – Vol. 37], cats [2], birds [Breuer-Strosberg R., et al. // Mycoses. – 1990. – Vol. 33, №5] and many other mammals and associated with superficial infections of the skin and associated structures, including pityriasis versicolor and folliculitis, disseminated infections in IV-neonates [1]. Also it was reported as agents of more invasive human diseases including deep-line catheter-associated sepsis [Marcon M.J., Powell D.A. // Clin. Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 5]. Previously, some aspects of budding process [Bond R., et al. // J. Small Anim. Pract. – 1996. – Vol. 37] and cell structure [3-6 and Gabal M.A., Fagerland J.A. // Mycoses. – 1979. – Vol. 22; Nishima K., et al. // Med. Mycology. – 1991. – Vol. 29, №6; Winiarczyk S. // Arch. Vet. Pol. – 1992. – Vol. 32] were investigated using scanning, transmission and freeze-fracture methods of electron microscopy. The aim of this work was investigation of the cell components changes during *in vitro* growing in yeast *M. pachydermatis* using modern methods of light, scanning and transmission electron microscopy and compare this data with previous literature.

MATERIALS AND METHODS

The cultures of two strains of *M. pachydermatis* (strain РКПГУ-1195 from Russian collection of pathogenic fungi and strain 40199 from Culture Collection of the Research Center of Pathogenic Fungi, Chiba University, Japan). The first strain was cultivated 10 days on solid wort agar at 28°. For scanning electron microscopy the part of fungal colonies with nutrient medium were fixed in 3% glutaraldehyde (in 0,1 M cacodylate buffer) for 3 hour, postfixed overnight in 1% osmium tetroxide in the same buffer, dehydrated by ethanol series (30% to 70%), critical-point dried (HCP-2) for 15 min, coated with gold and observed in JSM 35 (JEOL, Tokyo, Japan). The second strain was cultivated for 24 hour in YPD medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) bactopecton and 2% (w/v) glucose on shaker at 30 °C. For morphological characteristics of cultures, we made the temporary preparation of living cells and observed them under the phase-contrast microscope (Olympus BH-2RFCA). For transmission electron microscopy (TEM) the cells were collected by centrifugation and sandwiched between two copper grids. Then samples were then freeze-substituted in 2% osmium tetroxide/acetone at – 80 °C for 48 hour and embedded in epoxy resin according to the method described before [7]. Ultrathin sections (70 nm thick) were cut with diamond knife and stained with uranyl acetate and lead citrate and covered with Super Support Films (Nisshin EM, Tokyo, Japan) observed with JEM-1400EX transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

RESULT AND DISCUSSION

Scanning electron microscopy. Yeast cells were subspherical to ovoidal in form, 3,0-6,0-2,0-2,5 µm. Buds were as wide as the mother cells [1]. For mature mother cells, *M. pachydermatis* were typical percurrent [1], monopolar blastic budding [Nishima K., et al. // Med. Mycology. – 1991. – Vol. 29, №6] through broad scar (Fig. 1 a-e), which was border with prominent collarette (Fig. 1c-e). The diameter of the budding scar varied from 1 to 1.5 µm which correlated with data of another authors [3 and Nishima K., et al. // Med. Mycology. – 1991. – Vol. 29, №6]. Under the lower magnification it was visible the adhesiveness feature of cells which situated on different developmental stages (Fig. 1 a). This peculiarity was accordant with observation about capability of cultures of this species to biofilm formation [8]. The cell wall surface structure was smoother in developing bud, but in mother and daughter cells they showed thin-granular texture (Fig. 1 b-e). Exactly after separation, the mother and daughter cells, as a rule, were also localized on tight lateral contact (Fig. 1 e). The cause of this lateral contact may be stipulated by not simultaneous medium (light) part septum disintegration – but in direction from one part to another.

Phase-contrast microscopy. Peculiarity of yeast cells walls (Fig. 1 f) was obvious, including the stage of budding (Fig. 1 g).

Transmission electron microscopy. Mother cells

before budding. At the median cells section, it was obvious that nucleus occupied the main volume and localized in central part near cell wall (Fig. 1 i, h, 3 a). Nucleus was spherical (on the average 1,0 µm), with lower level of condensed chromatin which uniformly distributed in nucleoplasm. One big (on the average 0,6 x 0,8 µm) lenticular dark nucleolus was situated near nucleus envelope (Fig. 1 j). The low number of dark irregularly distributed ribosomes was observed on outer nucleus membranes. The number of vacuoles at median section was varied from 2 to 3. They were small in size, spherical, as a rule, closely localized and have identical content with tightly packed fibrillar material, which give them specific morphological features (Fig. 1 i, h). We revealed small differences in ultrastructure of vacuolar contents in *M. pachydermatis* in comparison with *Cryptococcus albidus* cells [9]. As a rule, the group of vacuoles were localized between the nucleus and lipid inclusion (Fig. 1 i) or under nucleus (Fig. 1 h). The mitochondrial number at median section varied from 2 to 5. They were localized near cell wall, as a rule spherical in form (from 0,5 to 0,7 µm). Large (on the average 1,0 µm) irregular in form and median electron density lipid inclusion (Fig. 1 i, h) was visible in the upper part of cells opposite the budding scar. From components of endomembrane system, it was possible to recognized only single (on median section) short straight granular cistern on endoplasmic reticulum (ER) in cell periphery near cell wall (Fig. 1 k). The dark ribosomes were compactly distributed on the surfaces of ER cisterns. The secretory vesicles and single Golgi cisterns on this and other budding stages were absent. For comparison, numerous secretory vesicles were present in *C. albidus* [9] growing in same condition.

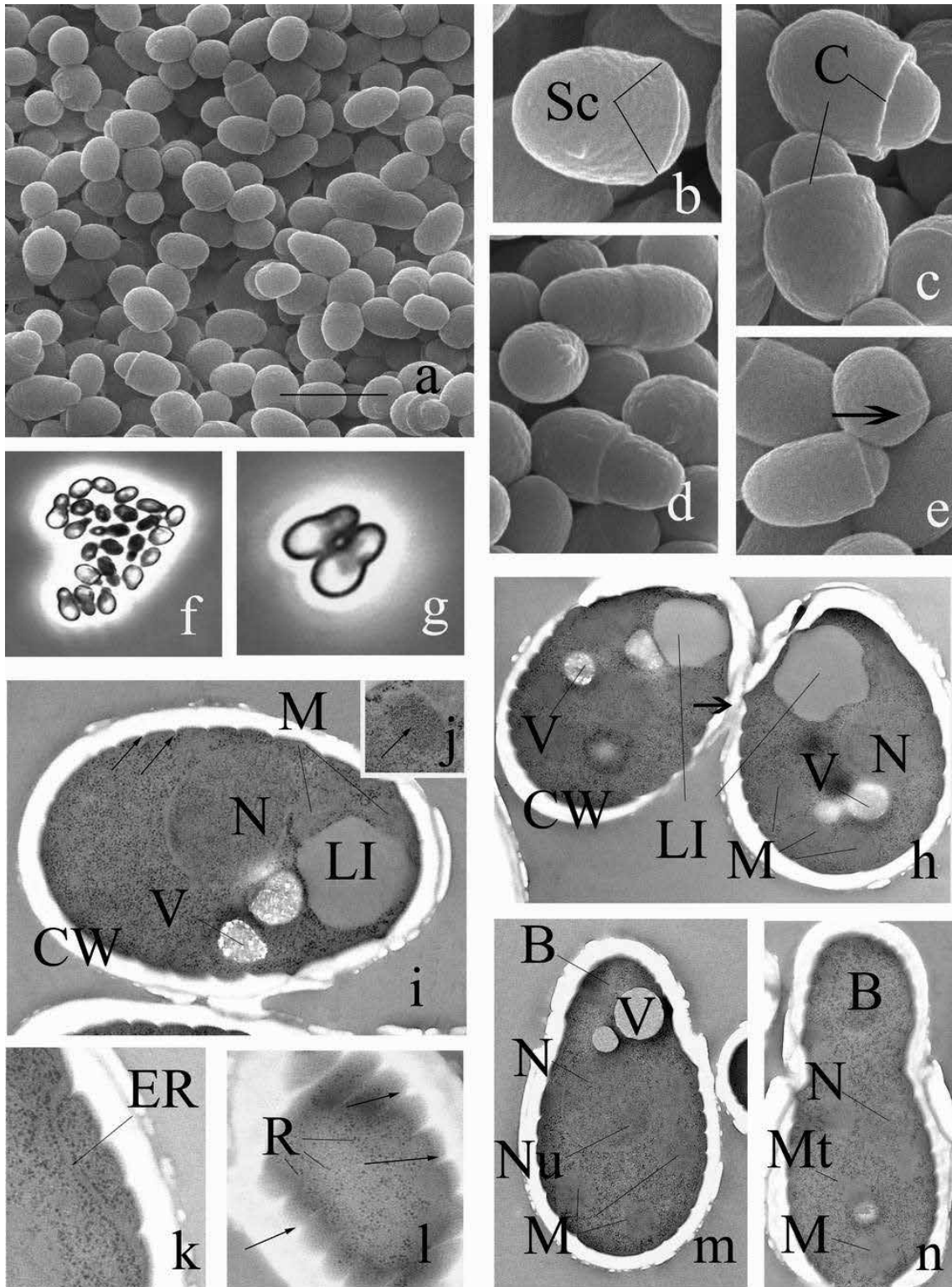


Fig. 1. Scanning (a-e), phase-contrast (f, g) and transmission electron microscopy (i-n) of budding *M. pachydermatis* cells. Explanation for this and another figures: B – bud, BC – budding cells; C – colarette, CW – cell wall, DC – daughter cell, ER – endoplasmic reticulum, LI – lipid inclusion, M – mitochondrion, MC – mother cell, Mt – microtubule, N – nucleus, Nu – nucleolus, R – ribosomes, S – septum, Sc – scar, Sp – septum, V – vacuole, Vs – vesicles. Scale: a = 15 μ m; b, c = 2 μ m; d, e, g, i = 0,5 μ m; f = 10 μ m; k, l, j = 0,3 μ m; h, m, n – 1 μ m

Cytosol had a higher electron density, rich with free ribosomes in form of mono- or polysome. Plasma membrane formed the small light narrow (on median section) and more lengthy on skate paradermal sections (Fig. 1 l, arrows) «edge-like» symmetrically localized ring-like swellings which previously detected in typical for *M.*

pachydermatis and another species from genus *Malassezia* [3, 4 and Nishima K., et al. // Med. Mycology. – 1991. – Vol. 29, №6]. The presence of this cell walls thickening provide its rigidity and protective features. Periplasmic space was absent, because that plasma membrane situated in close contact with cell wall. Cell wall was thick

(on the average 0,3 μm), light, with two distinct layers: lower thick (Fig. 2 b, 1) identical in thickness (on average 0,2 μm) and upper thin (on average 0,1 μm) and discontinuous (Fig. 2 b, 2). The presence of upper layer, as it was obvious in fig. 1 h (arrow demonstrate the place

of cell adhesion) provide the cell wall surface structure and ensure its adhesive peculiarity. Another authors [3, 4] also revealed the presence the thick cell wall in cell of this species.

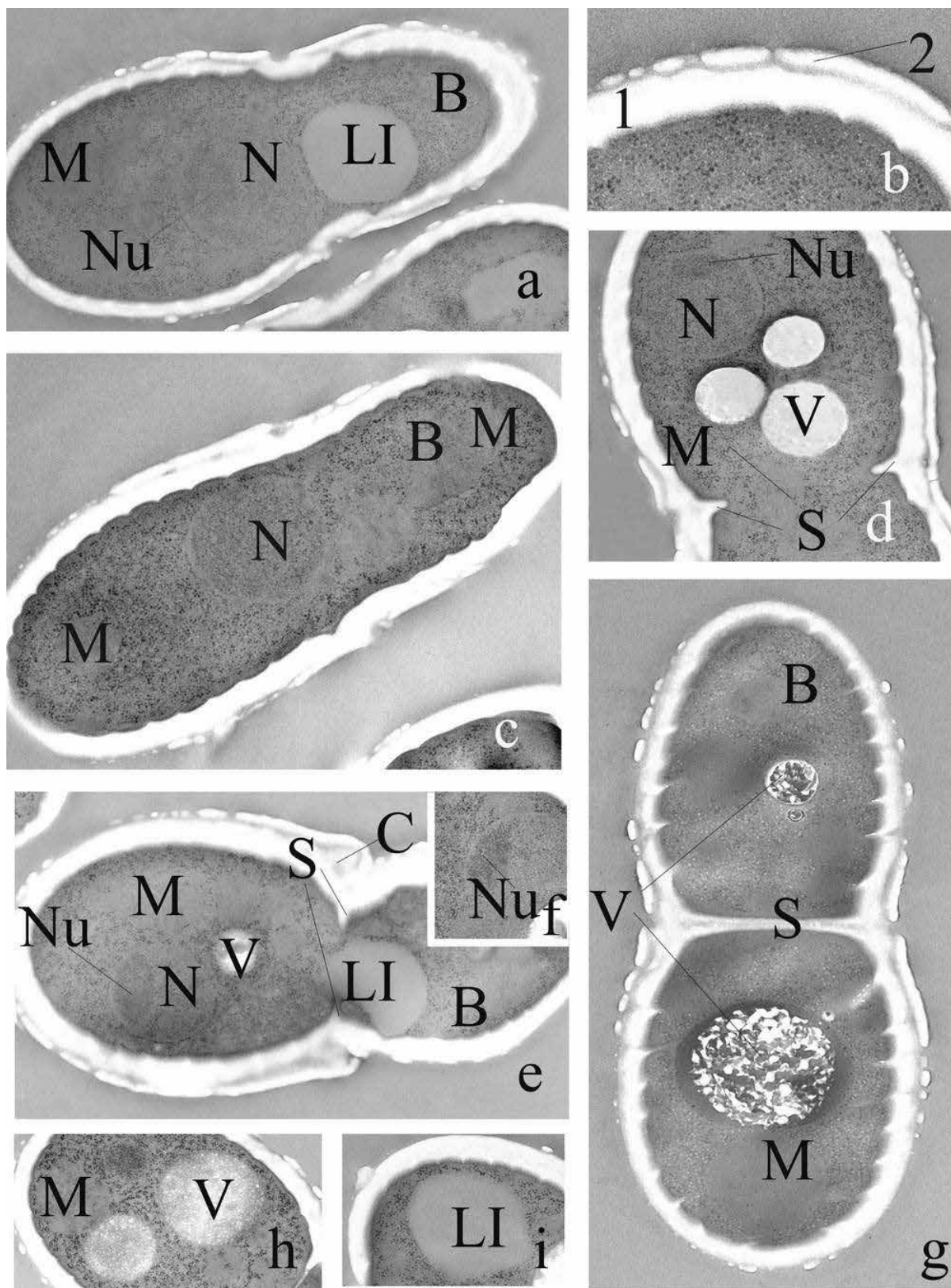


Fig. 2. General view (a, c, e, g) and fragments (b, d, f, h, i) of budding cells *M. pachydermatis* under transmission electron microscope. Scale: a, c, d, e, g, = 1 μm ; b, f, h, i = 0.5 μm

Budding. At the early stage of bud formation, the cytosol with free ribosomes was revealed in its content (Fig. 1 n). During budding, the density of free ribosomes distribution regarding the visual evaluation was similar in mother and bud compartments. Nucleus in mother cells was translocated under isthmus (Fig. 1n). Several short microtubules were revealed in central part of mother cell (Fig. 1 n) and inside isthmus. Cytoplasmic microtubules were also observed during budding of *M. pachydermatis* cells using fluorescence microscopy [4].

Later several small vacuoles (Fig. 1 m, 3 b, c), single mitochondria (from 1 to 2 on median section) migrate from mother cells into bud (Fig. 2 c). Thus, the specific peculiarities of budding of investigated *M. pachydermatis* were the lower level of mitochondria, which is different from *C. albidus* [9].

Similar presence of several small vacuoles and small number of single mitochondria were visible during budding (Fig. 1), during (Fig. 3 e) and after septum formation (Fig. 2, 3 f) of the cells of same fungal species according David M. et al. [4]. In the apex of the growing *M. pachydermatis* bud David M. with co-authors [3] revealed small vesicles.

Notice, that in early (Fig. 1 m, n, 2 a) and final stages (Fig. 2 e, d, g) of bud formation the isthmus was more apparent than in intermedian ones (Fig. 2 c). As a rule, the large lipid inclusion was apparent in bud before nucleus migration (Fig. 2 a) in this part of the system

from mother→ to developing bud. The level of nucleus chromatisation were increased (Fig. 2 c), when the bud was practically fully developed. The nucleus sizes in this period larger than in mother cell before budding (on the average 1,4 μm). Similar changes in nucleus were described for budding cells of *Cryptococcus albidus* [9]. Direct process of nucleus division was not observed in the present study. According to David M. et al. [4], this process was took places directly during nucleus moving through isthmus and as a result one nucleus revealed in mother and another in bud. Last authors, using fluorescent microscopy, revealed in dividing nucleus the spindle and astral microtubules.

The mother and daughter cells during and after cytokinesis. During cytokinesis the sizes of mother cells varied from 2,0-2,6 to 3-3,5 μm and the bud from 1,8-2,0 μm to 2,0-2,2 μm. Inside isthmus on the level of collar (Fig. 2 e, 3 e) were formed electron-transparent wedge-shaped centripetal growing (Fig. 2 d) septum. At this time, small (on average 1,0 μm) single nucleus revealed in the mother half (Fig. 1 e) and bud ones (Fig. 2 d). In both part of the system of mother→ to bud, the nucleus was localized in more distal (in cell periphery) from isthmus (Fig. 2 e, d). From last they «separated» with several small vacuoles. Eventually the continuous straight (on average 0,18 μm) light septum was formed (Fig. 2g, 3 f). The structure of nucleus in mother and bud half was similar: lower level of chromatin condensation and presence of large (0,6 x 0,8 μm) prominent lenticular

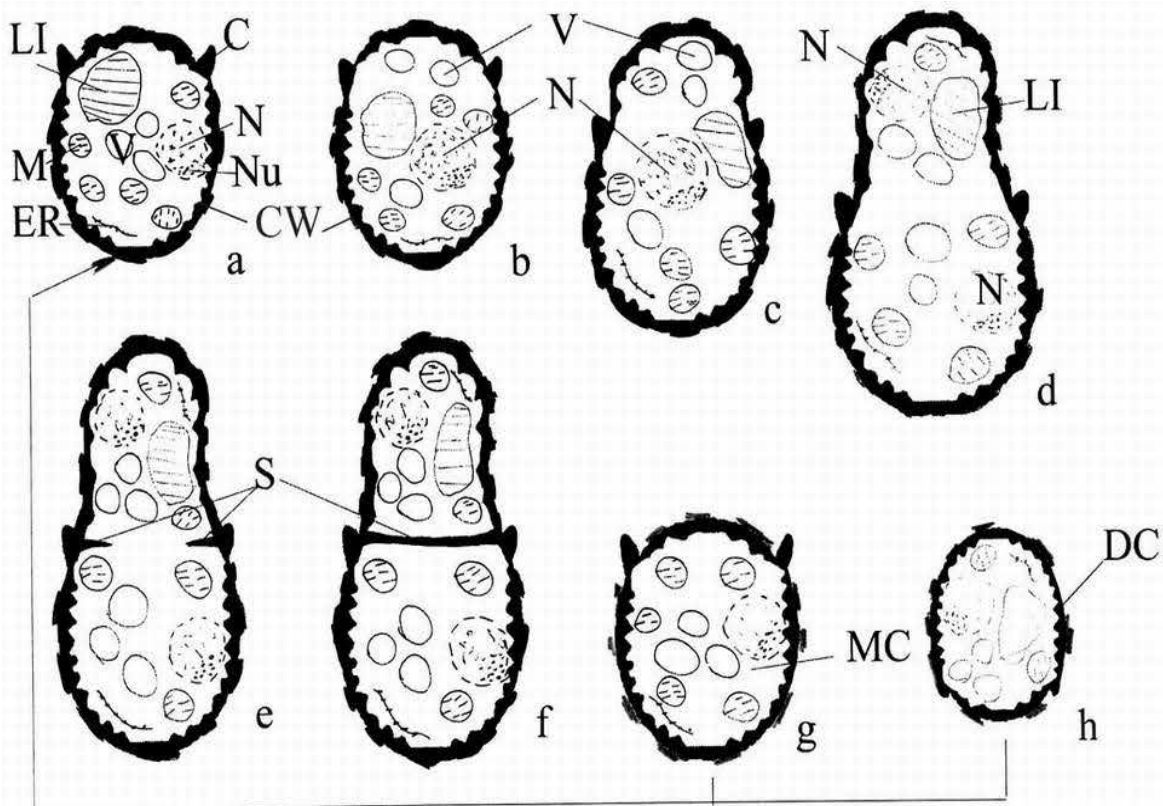


Fig. 3. Diagram showing the organelles transition during *M. pachydermatis* budding: a – mother cell before budding, b-d – mother cell during budding, e – mother and bud compartments during septum formation, f – mother and bud compartments with formed septum, g – mother cell after separation from daughter cell, h – daughter cell after separation from mother cell

nucleolus (Fig. 2 d, e) were observed. Probably the cell wall material from which composed collarette partially remains around bud scar (Fig. 1 e, arrow).

In this period the volume of bud was smaller in comparison with mother but the number and structure of organelles, components of endomembrane system and free ribosomes were similar. Exclusion compose the presence of large lipid inclusion which may immigrate into bud content not only before septum formation (Fig. 2 a), but also during this process (Fig. 2 e). The presence of storage lipids in daughter cells (Fig. 2 I, 3 h) gives them advantage for rapid and valuable growth and differentiation. In our opinion, the presence in *C. albidus* [8] mother cell large vacuole and respectively in *M. pachydermatis* large lipid inclusion between budding scar and interphase nucleus in mother cell temporary block process of budding which allow last situated in «rest» condition. Investigations of another yeast species in same condition and stage let the universality of this finding.

As it was revealed in fig. 2-g, the main pattern of cell walls structure in mother and daughter cell formation was similar; differences in wall thickness were obvious. For daughter cell, thin wall (on average 0,2 μm) in comparison with mother (on average 0,3 μm) one was typical. The growth of daughter cell occurs with participation of vacuoles whose sizes in this period considerably increased (Fig. 2 h). In content of mother cell, the synthesis of storage lipid inclusion (Fig. 3 g-a) later took places.

RESUME

The scanning electron microscopy showed that for *M. pachydermatis* mother and daughter cells were typical the cell wall with thin-granular texture. The cell surface structure was smooth in developing bud.

In exponential phase mother cells it was typical the lower level of vacuolization, small number of mitochondria, presence of single cistern of ER, absence of secretory vesicles and presence of big lipid inclusion opposite budding scar. The uniformity in vacuolar content structure in this and all subsequent developmental stages was revealed. For interphase nucleus, central-lateral topography and lower level of condensed chromatin was typical.

During bud formation the number of mitochondria, storage inclusion and cisterns of ER were not increased contrary to the volume of cytosol and numbering of free ribosomes. Before budding, the increase in nucleus sizes and level of chromatisation were revealed in mother cell. The mother cell after septum formation differs from daughter cell in the larger volume of cytosol and the presence of thick cell wall. Contrary to mother cell, daughter cell showed small volume of cytosol, free ribosomes and presence of large storage lipid inclusion.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors were grateful to head of Russian Collection of Pathogenic Fungi Chilina G.A. for assign of fungal cultures.

REFERENCES

1. de Hooge G.S., et al. Atlas of clinical fungi (a recent electronic version 3.1). – 2011.
2. Volk A.V., Belyavin C.E., Varjonen K., et al. *Malassezia pachydermatis* and *M. nana* predominate amongst the cataneous mycobiota of *Sphynx cats* // *J. Feline Med. Surg.* – 2010. – Vol. 12, №12. – P. 917-922.
3. David M., Gabriel M., Kopecká M. Unusual ultrastructural characteristics of the yeast *Malassezia pachydermatis* // *Scripta medica (Brno)*. – 2003. – Vol. 76, № 3. – P. 173-186.
4. David M., Gabriel M., Kopecká M. Microtubular and actin cytoskeletons and ultrastructural characteristics of the potentially pathogenic basidiomycetous yeast *Malassezia pachydermatis* // *Cell Biology International*. – 2007. – Vol. 31. – P. 16-23. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.09.001.
5. Guého-Kellerman E., Boekhout T., Begerow. Biodiversity, phylogeny and ultrastructure. In: *Malassezia* and the skin // Springer Link. – 2010. – P. 17-63.
6. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. The yeast a taxonomic study. 5th ed. – 2012. – 1500 p.
7. Yamaguchi M., Okada H., Namiki Y. Smart specimen preparation for freeze substitution and serial ultrathin sectioning of yeast cells // *J. Electron Microsc.* – 2009. – Vol. 58. – P. 261-266.
8. Figueredo L.A., Cafarchia C., Desantis S., Otranto D. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dog // *Vet. Microbiol.* – 2012. – Vol. 9, №160. – P. 126-131.
9. Yamaguchi M., Shimizu K., Kawamoto S., et al. Dynamics of cell components during budding of *Cryptococcus albidus* yeast cells // *J. Problems of Med. Mycol.* – 2014. – Vol.16, №1. – P. 29-35.

Поступила в редакцию журнала 24.10.2014

Рецензент: А.Е. Сергеева



МИКОЦИНО- ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТЕЛЕОМОРФ И ВИДОВ КРИПТОКОККОВ ПОРЯДКА TREMELLALES

Голубев В.И. (в.н.с.)*

Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пушкино, Россия

©Голубев В.И., 2014

Анаморфные и телеоморфные представители порядка Tremellales различаются по чувствительности к микоцинам тремелловых дрожжей, и в этом отношении телеоморфы перемешаны с видами Cryptococcus. Как правило, разные изоляты одного вида идентичны по микоциночувствительности, которая видоспецифична.

Ключевые слова: киллер-токсин, *Cryptococcus*, микоцин, таксономия, фунгицид

MYCOCIN SENSITIVITY PATTERNS OF TELEOMORPHS AND CRYPTOCOCCUS SPECIES OF THE TREMELLALES ORDER

Golubev W.I. (leading scientific
collaborator)

Russian Collection of Microorganisms (VKM),
G.K. Skryabin Institute for Biochemistry and Physiology
of Microorganisms, Pushchino, Russia

©Golubev W.I., 2014

Anamorphic and teleomorphic representatives of the order Tremellales differ in their sensitivity to mycocins of tremellaceous yeasts, and in this respect the teleomorphs are intermingled with Cryptococcus species. As a rule, various isolates of a species are identical in mycocin sensitivity pattern that is a species-related property.

Key words: *Cryptococcus*, fungicide, killer-toxin, mycocin, taxonomy

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжевые грибы рода *Cryptococcus* Vuillemin широко распространены в природе. Их постоянно обнаруживают на вегетирующих растениях, растительных остатках, в воздухе, почве, морских и пресных водоемах во всех регионах земного шара – от полярных до тропических. Ряд видов этого рода представляет интерес в качестве продуцентов ли-

пидов [Turcotte G., Kosaric N. // Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. – 1989. – Vol. 40] и внеклеточных полисахаридов [Jeanes A. // Food Technology. – 1974. – Vol. 28, №5]. Другие виды и, в частности, типовой вид рода – *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (телеоморфа – *Filobasidiella neoformans* Kwon-Chang) вызывают заболевания у человека и животных [Krajden S., et al. // J. Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 29, №9].

Известно, что виды криптококков и близких им родов секретируют белки или гликопротеины (микоцины, киллер-токсины), обладающие антифунгальной активностью, в том числе – и против патогенных грибов [Голубев В.И. и др. // Проблемы мед. микологии. – 2000. – Т. 2, №3]. По физико-химическим характеристикам, генетической детерминации, механизмам действия микоцины между собой различаются, но неизменна их активность, прежде всего, против таксономически и филогенетически родственных микоциногенным штаммам организмов. Исходя из этой особенности, можно информацию о микоциночувствительности рассматривать в качестве ценного дополнительного таксономического критерия [1].

Как и большинство анаморфных таксонов, род *Cryptococcus* полифилетичен. Согласно результатам сиквенирования генов рРНК, виды этих базидиомицетовых дрожжей принадлежат к порядкам *Filobasidiales*, *Holtermanniales*, *Trichosporonales* и *Tremellales* [2]. В настоящей работе установлены профили чувствительности тремелловых видов криптококков и представителей восьми телеоморфных родов последнего порядка к микоцинам, секретируемым 14 штаммами тремелловых дрожжевых грибов девяти видов родов *Bullera* Derx, *Cryptococcus* и *Hannaella* Bai et Wang.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перечень продуцентов микоцинов и ссылки на публикации, в которых охарактеризована их микоциногенная активность, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Список использованных микоциногенных штаммов

Виды, штаммы	Ссылки
<i>Bullera alba</i> (Hanna) Derx ВКМ Y-2829	[Golubev W., et al. // Mycoscience. – 1997. – Vol. 38, №1]
<i>B. hanae</i> (Hamamoto et Nakase) ВКМ Y-2832	[Golubev W.I., et al. // J. Gen. Appl. Microbiol. – 1996. – Vol. 42, №6]
<i>B. unica</i> Hamamoto et Nakase ВКМ Y-2830	[Голубев В.И., Наказе Т. // Микробиология. – 1998. – Т. 67, №2]
<i>Cryptococcus laurentii</i> (Kufferath) Skinner ВКМ Y-1627, 1628, 1665	[Голубев В.И., Кузнецова Л.Б. // Микробиология. – 1989. – Т. 58, №6]
<i>C. nemorosus</i> Golubev et al. ВКМ Y-2906	[3]
<i>C. perniciosus</i> Golubev et al. ВКМ Y-2905, 2907	[3]
<i>C. pinus</i> Golubev et Pfeiffer ВКМ Y-2958	[4]
<i>C. podzolicus</i> (Bab'eva et Reshetova) Golubev ВКМ Y-2247, 2249, 2908	[Голубев В.И. // Микробиология. – 1991. – Т. 60, №6.]
<i>Hannaella sinensis</i> Li (Bae et Wang) var. <i>lactis</i> Li (Bae et Wang) ВКМ Y-2826	[Golubev W.I., Nakase T. // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – Vol. 146, №1]

Все типовые штаммы обследованных видов криптококков и дрожжевые фазы (за исключением *F. neoformans*) видов родов *Bulleromyces* Boekhout et Fonseca, *Kwoniella* Statzell-Tallman et Fell, *Sirobasidium*

* Контактное лицо: Голубев Владислав Иванович
e-mail: wig@ibpm.pushchino.ru

Lagerheim et Patouillard, *Fibulobasidium* Bandoni, *Fibulosidiella* Kwon-Chang, *Papiliotrema* Sampaio et al., *Tremella* Persoon, *Trimorphomyces* Bandoni et Oberwinkler получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, <http://www.vkm.ru/>).

Для тестирования на чувствительность к микоцинам использовали среду с цитрат-фосфатным буфером (рН 4.0, 4.5, 5.0 и 5.0) следующего состава (г/л): глюкоза – 5, пептон – 2.5, дрожжевой экстракт – 2, глицерин – 50 мл, агар – 20. На эту среду наносили 0,05 мл суспензии (примерно 105 клеток/мл) обследуемых 2-3-суточных культур, выращенных на сусло-агаре, тщательно растирали шпателем и затем штрихом наносили обильный инокулюм 5-6-суточных культур микоциногенных штаммов. Засеянные таким образом чашки инкубировали при комнатной температуре (18-20 °С), иногда также при 5 °С до появления роста газона. При формировании зоны подавления роста шириной несколько миллиметров

вокруг микоциногенного штамма посеянную газонную культуру регистрировали как чувствительную. Если зона подавления роста не превышала 1-2 мм и нередко при дальнейшей инкубации зарастала, то такие штаммы относили к слабо чувствительным. При отсутствии зоны ингибирования роста штаммы считали нечувствительными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все обследованные тремелловые грибы чувствительны к каким-либо из микоцинов, продуцируемых представителями своего порядка (табл. 2).

Наиболее узок спектр действия микоцина *B. hannaе* ВКМ Y-2832, активный лишь против пяти из обследованных видов. За ним по возрастанию диапазона действия следуют микоцины, секретирруемые *C. laurentii* ВКМ Y-1628, *C. nemorosus* ВКМ Y-2906, *C. podzolicus* ВКМ Y-2249, а далее – *B. unica* и *C. podzolicus* ВКМ Y-2247, 2908. Наиболее широки-

Таблица 2

Чувствительность видов телеоморф и криптококков порядка Tremellales к микоцинам, секретирруемым тремелловыми дрожжами

Виды, штаммы	Микоциногенные штаммы, ВКМ Y-											
	2832	2249	1628	2906	2830	2247 2908	1627	2905 2907	1665	2826	2829	2958
<i>Cryptococcus podzolicus</i> ВКМ Y-1982, 2111-2113, 2248, 2873	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. dimennae</i> ВКМ Y-1644	+	+	+	с	с	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tremella indecorata</i> ВКМ Y-2775	+	с	+	с	с	+	+	+	+	с	+	+
<i>Kwoniella heveanensis</i> ВКМ Y-1457	+	+	с	+	с	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. skinneri</i> ВКМ Y-1283	+	с	с	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bulleromyces albus</i> ВКМ Y-2141	-	+	+	+	с	+	с	+	+	+	с	+
<i>C. flavescens</i> ВКМ Y-1595	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sirobasidium magnum</i> ВКМ Y-2730	-	с	с	с	-	+	+	+	+	+	+	с
<i>T. fuciformis</i> ВКМ Y-2761	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	с	+
<i>T. simplex</i> ВКМ Y-2683	-	с	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>T. samoensis</i> ВКМ Y-2773	-	-	-	+	+	-	с	+	с	+	+	+
<i>Fibulobasidium inconspicuum</i> ВКМ Y-2732	-	-	-	-	с	+	+	с	+	с	+	+
<i>T. foliacea</i> ВКМ Y-2680	-	+	-	-	+	+	с	+	+	с	+	+
<i>T. mycophaga</i> ВКМ Y-2682	-	+	-	+	с	+	-	+	-	+	с	+
<i>C. laurentii</i> ВКМ Y-1627, 1665	-	+	-	с	+	+	-	+	х	+	с	+
<i>C. laurentii</i> ВКМ Y-1628	-	+	х	-	+	+	-	+	+	+	с	+
<i>C. allantoinivorans</i> ВКМ Y-2933	-	-	+	-	с	-	+	+	+	с	+	+
<i>Trimorphomyces papilionaceus</i> ВКМ Y-2921	-	с	+	с	-	+	+	+	+	с	-	-
<i>C. parafflavus</i> ВКМ Y-2923, PTZ 442, 444	-	-	+	+	с	+	+	-	+	-	+	+
<i>T. aurantia</i> ВКМ Y-2678	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>T. encephala</i> ВКМ Y-2679	-	-	с	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>T. subanomala</i> ВКМ Y-2797	-	-	-	-	с	-	с	+	+	+	+	+
<i>C. aureus</i> ВКМ Y-328	-	-	-	-	с	-	+	+	с	+	+	+
<i>C. peneaus</i> ВКМ Y-1291	-	-	-	-	с	-	с	+	с	с	+	+
<i>Fibulosidiella neoformans</i> CBS 132	-	-	-	-	с	с	-	+	-	с	+	+
<i>C. pernicius</i> ВКМ Y-2905, 2907	-	-	+	-	-	с	+	х	+	+	-	+
<i>C. nemorosus</i> ВКМ Y-2906	-	-	с	х	-	с	+	-	+	+	-	+
<i>C. pinus</i> ВКМ Y-2958	-	-	-	-	-	+	с	+	+	-	-	х
<i>Papiliotrema bandonii</i> ВКМ Y-2917	-	-	-	-	-	-	с	-	с	+	-	+
<i>C. carnescens</i> ВКМ Y-720	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>C. victoriae</i> ВКМ Y-2936	-	-	-	-	-	с	-	с	-	-	+	+
<i>C. flavus</i> ВКМ Y-2232	-	-	-	-	-	-	с	-	с	-	-	с
<i>Fil. amylo lenta</i> ВКМ Y-2227	-	-	-	-	-	-	-	с	-	+	+	-
<i>T. mesenterica</i> ВКМ Y-2681	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Примечание: жирным шрифтом выделены телеоморфы, чувствителен (+), слабо чувствителен (с), не чувствителен (-)

ми спектрами действия характеризуются микоцины, секретлируемые штаммами *B. alba* ВКМ Y-2829, *C. laurentii* ВКМ Y-1627, 1665, *C. pernicius* ВКМ Y-2905, 2907, *C. pinus* ВКМ Y-2958 и *H. sinensis* ВКМ Y-2826. К ним чувствительно большинство протестированных видов как телеоморфных родов, так и рода *Cryptococcus*. Среди микоцинов широкого спектра действия в качестве перспективных антифунгальных агентов, в частности, против возбудителя криптококкоза, можно отметить микоцины, образуемые *B. alba* ВКМ Y-2829 и *C. pinus* ВКМ Y-2958, из которых первый отличается повышенной термостабильностью, и оба характеризуются устойчивостью к ряду протеаз [4 и Golubev W., et al. // *Mycoscience*. – 1997. – Vol. 38, №1].

Виды криптококков и телеоморфных родов по микоциночувствительности перемешаны между собой. Заметной локализации, обособления в этом отношении каких-либо видов или родов не прослеживали.

Чувствительностью ко всем использованным микоцинам характеризуются виды *C. podzolicus*, *C. dimennae* и *T. indecorata*. К ним примыкают нечувствительные лишь к одному-двум микоцинам *B. albus*, *C. flavescens*, *C. skinneri*, *K. heveanensis*, *S. magnum* и *T. simplex*. К наименьшему числу микоцинов тремелловых дрожжей чувствительны *C. carnescens*, *C. flavus*, *C. pinus*, *C. victoriae*, *P. bandonii* и *T. mesenterica*.

Штаммы одного вида идентичны (*C. paraflavus*, *C. podzolicus*) либо очень сходны (*C. laurentii*) по микоциночувствительности. Отметим, что культуры *C. laurentii* ВКМ Y-1628 и -1665 при скрещивании на кукурузном агаре образовывали конъюгационные трубки, но конъюгации и формирования мицелия не наблюдали. Положительных результатов не достигли и при внутривидовом скрещивании штаммов *C. paraflavus* и *C. podzolicus*.

Профиль чувствительности каждого из обследованных видов к использованному набору микоцинов уникален, хотя некоторые в этом отношении различаются лишь по степени чувствительности (*C. aureus* – *C. peneaus*, *C. nemorosus* – *C. pernicius*, *C. carnescens* – *C. victoriae*). Выявленные отличия по микоциночувствительности, в подавляющем числе случаев, могут быть использованы при идентификации, дифферен-

циации видов *Cryptococcus* от дрожжевых фаз видов телеоморфных родов *Tremellales*, часто практически неотличимых от криптококков по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.

Виды, сходные по микоциночувствительности, порой близки и филогенетически (например, *C. nemorosus* – *C. pernicius*, *C. carnescens* – *C. victoriae*), но нередко их группирование по результатам сиквенирования D1/D2 региона гена рРНК и чувствительности к микоцинам существенно различается. Так, виды *C. carnescens* и *C. dimennae*, объединяемые в филогруппу *victoriae*, различаются между собой по чувствительности к семи микоцинам (табл. 2). Эти несоответствия связаны, вероятно, с тем, что к настоящему времени филогенетический анализ рассматриваемых организмов основан на данных лишь частичного сиквенирования одного гена, и эти результаты следует рассматривать как предварительные.

Другой причиной таких несоответствий, особенно, при обследовании родственных таксонов, может быть наличие перекрестного иммунитета. Вероятность иммунологического сходства в таких случаях существенна, поскольку исследованные нами микоциногенные штаммы таксономически и филогенетически близки. В связи с этим подчеркнем, что тестирование на реакцию к микоцинам не дифференцирует принципиально разные типы нечувствительности, которая может быть обусловлена либо устойчивостью, либо иммунитетом. Устойчивые клетки лишены рецепторов, связывающих микоцины, т.е. от чувствительных они отличаются структурой, составом клеточной стенки, цитоплазматической мембраны, биогенез которых детерминирован ядерным геномом. Микоциногенные же штаммы нечувствительны к собственному микоцину, поскольку он (или его предшественник) содержит компонент, обеспечивающий их иммунитет к нему. Иммунитетом обладают и так называемые нейтральные штаммы, содержащие генетические детерминанты синтеза микоцина, но образующие его в неактивной форме или неспособные его секретировать. При утрате генетических детерминант синтеза микоцина штамм теряет иммунитет к нему, т.е. в отличие от устойчивости, таксономически специфичной, иммунитет, как и способность продуцировать микоцин, является штаммовым признаком.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Голубев В.И. Микоцинотипирование // *Микология и фитопатология*. – 2012. – Т. 46, №1. – С. 3-13.
2. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A Taxonomic Study*. – Amsterdam, Elsevier B.V., 2011. – 2080 p.
3. Golubev W.I., Gadanho M., Sampaio J.P., Golubev N.W. *Cryptococcus nemorosus* sp. nov. and *Cryptococcus pernicius* sp. nov. related to *Papiliotrema* Sampaio et al. (Tremellales). // *Int. J. System. Evol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 53, №3. – P. 905-911.
4. Голубев В.И. Антитремелломицетовая активность микоцина *Cryptococcus pinus* // *Микробиология*. – 2009. – Т. 78, №3. – С. 355-361.

Поступила в редакцию журнала 11.11.14
Рецензент: Н.П. Елинов



АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ АНТИБИОТИКА АМИКАЦИНА

¹Ананьева Е.П.* (зав. кафедрой), ¹Караваяева А.В. (ст. преподаватель кафедры), ²Соловский М.В. (в.н.с.)

¹ Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия (кафедра микробиологии); ² Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2014

Были получены водорастворимые полимерные комплексы амикацина с сополимерами N-винилпирролидона (ВП) с кротоновой кислотой (КК), а также с полисахаридом лютеланом, образующим дрожжами рода *Cryptococcus*, содержащие 20% и 25% антибиотика. Комплексообразование амикацина с сополимерами ВП-КК подтверждено определением предельных емкостей связывания амикацина этими сополимерами. Полученные полимерные комплексы сохраняют высокий уровень и широкий спектр антимикробного действия, присущие амикацину. Установлено, что полимерные комплексы амикацина на основе сополимера ВП-КК по значению полулетальной смертельной дозы (LD₅₀) характеризуются в 4 раза меньшей острой токсичностью, чем немодифицированный полимерами амикацин.

Ключевые слова: амикацин, дрожжевой полисахарид, острая токсичность, полимерный комплекс амикацина, противомикробная активность, сополимер N-винил-2-пирролидон-кротоновой кислоты

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF POLYMERIC COMPLEXES OF ANTIBIOTIC AMIKACIN

¹Ananieva E.P. (head of the chair), ¹Karavaeva A.V. (senior lecturer of the chair), ²Solovskij M.V. (leading scientific collaborator)

¹ Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy; ² Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2014

Hydrophilic polymeric complexes of amikacin with copolymers N-vinyl-2-pyrrolidone-crotonic acid and polysaccharide lutelan which was formed by yeasts of the *Cryptococcus* genus have been obtained. The content of antibiotic amikacin in the complexes was come to the bound 20-25%. Formation complexes of amikacin with copolymers N-vinyl-2-pyrrolidone-crotonic acid were confirmed by definition limit capacity binding of amikacin with copolymer. The polymeric complexes were

* Контактное лицо: Ананьева Елена Петровна,
Тел: (812) 571-74-39

preserved the high level and broad-spectrum of antimicrobial action. It was established that polymeric complexes of amikacin on the basis of copolymers N-vinyl-2-pyrrolidone-crotonic acid by values LD₅₀ were characterized by four times less of acute toxicity as compared with non-modified amikacin.

Key words: acute toxicity, antimicrobial action, amikacin, biosynthetic polysaccharide, copolymers N-vinyl-2-pyrrolidone-crotonic acid, polymeric complex of amikacin

ВВЕДЕНИЕ

Амикацин – полусинтетический антибиотик из группы аминогликозидов, обладающий широким спектром антимикробного действия. Резистентность к амикацину развивается медленно. К недостаткам этого антибиотика, как и всех аминогликозидов, следует отнести проявление токсичности, в частности, ото- и нефротоксичность [1].

Известно, что комплексообразование аминогликозидов с биосовместимыми полимерами приводит к снижению острой токсичности данных антибиотиков [Соловский М.В. и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – Т. 45, №6].

Цель работы – получение полимерных комплексов амикацина, исследование их острой токсичности и изучение антимикробной активности.

Для модификации амикацина, содержащего реакционноактивные аминогруппы, в качестве полимерных носителей использовали нетоксичные синтетические сополимеры N-винилпирролидона (ВП) с кротоновой кислотой (КК) [Соловский М.В. и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – Т. 45, №6] и высокомолекулярный полисахарид лютелан, образующий дрожжами *Cryptococcus luteolus*, содержащий звенья глюкуроновой кислоты [Витовская Г.А. и др. // Биоорганическая химия. – 1988. – №10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сополимеры N-винилпирролидона с кротоновой кислотой (ВП-КК) получали путем радикальной сополимеризации в изопропанол в запаянных ампулах в атмосфере аргона в присутствии инициатора азоизобутиронитрила. Состав сополимеров определяли потенциометрически, по содержанию карбоксильных групп, молекулярную массу – вискозиметрическим методом [Павлов Г.М. и др. // Высокомоле. соед. – 1990. – 32А].

Внеклеточный полисахарид лютелан получали при культивировании *C. luteolus* в жидкой синтетической питательной среде, клетки отделяли центрифугированием, а из упаренного на вакуум-выпарном аппарате нативного раствора полисахарид осаждали спиртом этиловым [Витовская Г.А. и др. // Биоорганич. химия. – 1988. – №10].

Для получения полимерных комплексов амикацина сульфат переводили в амикацина основание (далее – амикацин) методом ионообменной хроматографии на ЭДЭ-10П в ОН⁻ форме. Амикацин выделяли из щелочного фильтрата путем лиофильной сушки.

Комплексообразование амикацина с сополимера-

ми ВП-КК и лютеланом проводили в воде при перемешивании и массовом соотношении антибиотик : полимер, равном 0,25-0,33 : 1. Полученный раствор лиофильно сушили. Содержание амикацина в полимерных производных устанавливали методом спектроскопии [Snyder S.L., Sobocinski P.Z. // *Analyt. Biochem.* – 1975. – Vol. 64, №2].

Для определения антимикробной активности полученных амикацина основания и его комплексов использовали тест-микроорганизмы, указанные в Государственной Фармакопее (ГФ) XII: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 209P, а также тест-штаммы микроорганизмов, полученные из НИИ ортопедии и травматологии им. Вредена: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 14153, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* 6538.

Антимикробную активность выявляли методом серийных разведений в жидких питательных средах (МПБ) с последующим высевом на плотную питательную среду (МПА) для определения бактерицидного или бактериостатического действия препарата [2, 3]. Микробная нагрузка составляла $5 \cdot 10^4$ клеток/мл тест микроорганизмов.

Исследование острой токсичности амикацина и его комплекса с сополимером ВП-КК выполняли согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [3]. Работу проводили на 30 белых беспородных мышах-самцах массой 18-22 г в возрасте 9-12 недель к моменту введения препаратов. Тестируемые вещества вводили однократно внутрибрюшинно в диапазоне доз от 1000 до 7940 мг/кг, ориентируясь на максимальный объем жидкости, допустимый при внутрибрюшинном введении мышам. В каждую группу (на каждую дозу) включали по 3 животных. Состояние мышей оценивали в течение первого часа, а также через 1, 3, и 14 суток после введения препаратов. Значение однократной полудетальной дозы (LD_{50}) рассчитывали экспресс-методом Прозоровского [Прозоровский В.Б. и др. // *Фармакология и токсикология.* – 1978. – №4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведены некоторые характеристики полученных полимерных комплексов амикацина.

Таблица 1

Полимер-носитель			Комплекс			
Обозначение	m, мол. %	Молекулярная масса, Да	Обозначение	Выход, %	Содержание амикацина, масс. %	
					вычислено	обнаружено
ВП-КК (1)	19,7	29000	A(20)+1	93,8	20	18,8
ВП-КК (1)	19,7	29000	A(25)+1	97,8	25	24,2
ВП-КК (2)	12,5	15000	A(20)+2	98,4	20	19,3
Лютелан	26,0	500000	A(20)+лютелан	80,4	20	...

Примечание: m – содержание – COOH групп в полимерах; A – амикацин.

В процессе комплексообразования участвуют карбоксильные группы сополимеров и первичные аминогруппы антибиотика. Комплексы содержали ~ 20-25% амикацина и хорошо растворялись в воде.

Процесс комплексообразования амикацина с сополимерами ВП-КК подтверждали определением предельных емкостей связывания амикацина (q, мг/г) сополимерами ВП-КК разного состава (табл. 2).

Таблица 2

Предельные емкости связывания амикацина сополимерами

образцы	Сополимер ВП-КК		q, мгА/г сополимера	
	ММ, Да	m, мол. %	H ₂ O	0,9% раствор NaOH
1	39000	8,7	150,5	64,7
2	15000	12,5	163,3	107,9
3	19000	18,3	261,0	163,6
4	29000	19,7	341,1	277,9
5	...	30,4	497,7	...
6	...	38,9	667,6	516,4

Примечание: ММ – молекулярная масса.

Как следует из данных таблицы 2, связывание антибиотика в воде и в изотоническом растворе хлорида натрия возрастает по мере увеличения содержания карбоксильных групп в сополимере. Кроме того, для одного и того же сополимера значения q уменьшаются при переходе от связывания в воде к связыванию в 0,9%-ом растворе NaCl. Согласно этим данным, превалирует электростатический характер взаимодействия антибиотика с сополимерами ВП-КК. Вместе с тем, нельзя исключить и контакты амикацина с макромолекулами сополимеров ВП-КК посредством водородных связей в ходе комплексообразования.

Антимикробная активность комплексов в отношении фармакопейных тест-штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* приведена в таблице 3.

Таблица 3

Антимикробная активность амикацина и его полимерных комплексов в отношении тест-микроорганизмов (ГФ XII), мкг/мл

Препарат	<i>E. coli</i> ATCC 5922	<i>S. aureus</i> 209 P	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	
	МБК	МБК	МИК	МБК
Амикацин (контроль)	32,0	8,0	8,0	16,0
A(20)+1	32,0 (6,4)	4,0 (0,8)	16,0 (3,2)	32,0 (6,4)
A(25)+1	16,0 (4,0)	4,0 (1,0)	16,0 (4,0)	32,0 (8,0)
A(20)+2	32,0 (6,4)	4,0 (0,8)	16,0 (3,2)	32,0 (6,4)
A+лютелан	64,0 (12,8)	48,0 (9,6)	32,0 (6,4)	32,0 (6,4)

Примечание: МИК – минимальная ингибирующая концентрация; МБК – минимальная бактерицидная концентрация. В скобках указаны значения МБК и МИК в пересчете на содержание антибиотика в комплексе.

Показано, что по сравнению с амикацином антибактериальная активность его полимерных комплексов [A(20)+1] и [A(20)+2] в отношении *S. aureus* возросла в два раза, хотя содержание антибиотика в комплексе составляло лишь 20%. В отношении *E. coli* минимальная бактерицидная концентрация (МБК) оставалась на уровне контроля. Однако при увеличении количества амикацина в комплексе с 20% до

25% наблюдали повышение антимикробной активности в 2 раза. Известно, что условно-патогенные бактерии *P. aeruginosa* обладают множественной устойчивостью к лекарственным препаратам. Антимикробная активность всех полимерных комплексов в отношении *P. aeruginosa* была в 2 раза меньше, чем контрольного препарата амикацина, причем отмечали бактериостатическое действие исследуемых образцов. При пересчете на содержание активного вещества (амикацина) в комплексах МБК в отношении данного тест-микроорганизма возрастала в 2-2,5 раза.

Особый интерес представляет комплекс амикацина с дрожжевым полисахаридом лютеланом, состоящий из маннозы, ксилозы и глюкуроновой кислоты, и с молекулярной массой 500.000 Да [Витовская Г.А. и др. // Биоорганическая химия. – 1988. – №10]. Лютелан, как и другие экзополисахариды дрожжей рода *Cryptococcus*, обладает широким спектром биологической активности. Этот гликан проявляет иммуномодулирующее, гипополипидемическое, энтеросорбционное действия [Елинов Н.П. Химия микробных полисахаридов. – М., 1984], а, имея в своей структуре значительное количество карбоксильных групп, способен образовывать комплексы с аминоклизидами. Показано снижение антимикробной активности амикацина в комплексе с лютеланом в отношении грамотрицательных бактерий в 2 раза, грамположительных – в 6 раз (табл. 3). Это может быть связано с высокой молекулярной массой (ММ) полисахарида (ММ лютелана в 25 раз выше, чем ММ синтетических сополимеров) и сложностью высвобождения антибиотика из комплекса. Однако при пересчете на содержание амикацина в комплексе, МБК в отношении *E. coli* и *P. aeruginosa* возрастает в 2,5 раза, а в отношении *S. aureus* отличается незначительно от контрольных значений. Также изучали антимикробную активность некоторых комплексов с тест-культурами, предоставленными НИИ травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена: *P. mirabilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4

Минимальная бактерицидная концентрация амикацина и его полимерных комплексов в отношении клинических штаммов бактерий, мкг/мл

Препарат	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. mirabilis</i>
	МБК	МБК	МИК	МБК	МБК
Амикацин (контроль)	8,0	8,0	8,0	16,0	32,0
A(25)+1	4,0 (0,8)	8,0 (2,0)	8,0 (2,0)	16,0 (4,0)	64,0 (16,0)
A(20)+2	8,0 (1,6)	8,0 (1,6)	32,0 (6,4)	64,0 (12,8)	64,0 (12,8)

Антимикробная активность исследованных комплексов не изменялась в отношении *K. pneumoniae* и *S. aureus*, но в пересчете на чистый антибиотик возрастала. Менее эффективным оказались комплексы в отношении *P. aeruginosa* и *P. mirabilis*, причем бактерии *P. mirabilis* обладали наименьшей чувствитель-

ностью как к амикацину, так и к его полимерным комплексам. Отметим, что при пересчете на содержание чистого антибиотика в комплексах оба образца оказались более активными, чем амикацин в отношении всех четырех микроорганизмов, в том числе и *P. mirabilis*.

При изучении острой токсичности было показано, что полудетальная смертельная доза полимерного комплекса амикацина составила 6050 ± 1100 мг/кг при размахе колебаний ее средней ошибки 5000-7200 мг/кг, а LD_{50} самого амикацина – 1540 ± 250 мг/кг при размахе колебаний ее средней ошибки 1300-1800 мг/кг (табл. 5).

Таблица 5

Острая токсичность *in vivo* амикацина, его полимерного комплекса и носителя при внутрибрюшном введении мышам

Препарат	LD_{50} , мг/мл
Сополимер ВП-КК 1	7100 [6]
Полимерный комплекс А(20)+1	6050 ± 1100
Амикацин	1540 ± 250

По этому показателю, согласно классификации токсичности веществ при парентеральных способах введения, амикацин относят к малотоксичным препаратам [4]. Еще меньшей токсичностью обладает полимерный комплекс амикацина, относящийся к 4 классу токсичности – не токсичные вещества, также как и использованный полимерный носитель (табл. 5).

Таким образом, показана возможность получения нетоксичных полимерных комплексов амикацина с сополимерами N-винилпирролидона с кротоновой кислотой, которые сохраняли антимикробную активность, имея в своем составе лишь 20-25% антибиотика.

ВЫВОДЫ

1. На основе сополимеров N-винилпирролидона с кротоновой кислотой и полисахарида лютелана получены полимерные комплексы амикацина с содержанием антибиотика 20 и 25%. Предполагаем наличие электростатического характера взаимодействия в комплексах.

2. Показано, что комплексы амикацина с синтетическими сополимерами ВП-КК в опытах *in vitro* проявляли выраженное антимикробное действие, сопоставимое с антибиотиком амикацином (в отношении грамотрицательных бактерий), а в отношении штаммов *S. aureus* превышали активность амикацина в 2 раза. Применение лютелана в качестве носителя для антибиотика приводило к снижению антимикробной активности комплекса, что, вероятно, связано с высокой молекулярной массой полисахарида.

3. В опытах *in vivo* острая токсичность комплексов амикацина с синтетическими сополимерами оказалась в 4 раза меньше токсичности амикацина ос- нования.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. – М: Новая волна, 2005. – 1206 с.
2. *Гунар О.В., Каграманова К.А.* Методы определения антимикробного действия лекарственных веществ // Хим.-фарм. журнал. – 2005. – №5. – С. 53-56.
3. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. I часть.* – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
4. *Березовская И.В.* Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Хим.-фарм. журнал. –2003. – №3. – С. 32-34.

Поступила в редакцию журнала 07.11.2014

Рецензент: Н.П. Елинов



НЕОБЫЧНЫЕ ВАРИАНТЫ *ASPERGILLUS* SPP. В КУЛЬТУРЕ

**Рябинин И.А.* (аспирант), Чилина Г.А.
(зав. лаб.), Богомолова Т.С. (зав. лаб.),
Михайлова Ю.В. (н.с.)**

Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2014

*Работа посвящена изучению штаммов 7 видов аспергиллов в культуре (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. ustus*, *A. calidoustus*, *A. sydowii* и *A. nidulans*). Штаммы клинического происхождения предварительно идентифицировали методами парциального ДНК-секвенирования и MALDI-TOF-масс-спектрометрии белкового экстракта. Для выращивания штаммов использовали следующие агаризованные питательные среды: агар Сабуро с 2% глюкозы, агар Чапека (классическую и с добавлением дрожжевого экстракта), картофельно-глюкозный агар, картофельно-морковный агар, среду с бенгальским розовым. В результате получены 13 необычных культуральных вариантов, которые следует учитывать впредь в лабораторных и клинических исследованиях.*

Ключевые слова: аспергиллы, изменчивость, колония

UNUSUAL VARIANTS OF *ASPERGILLUS* SPP. IN CULTURE

**Ryabinin I.A. (postgraduate student),
Chilina G.A. (head of the laboratory),
Bogomolova T.S. (head of the laboratory),
Mihaylova J.V. (scientific collaborator)**

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, Saint Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2014

*This work is dedicated to the study in culture of strains belonging to 7 *Aspergillus* species (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. ustus*, *A. calidoustus*, *A. sydowii* and *A. nidulans*). Strains of clinical origin were previously identified by 2 methods: partial DNA sequencing and MALDI-TOF-mass-spectrometry of protein extract. For the cultivation of strains following agarized nutrient media were used: Sabouraud agar with 2% dextrose; Czapek agar (classical and with addition of yeast extract), potato-dextrose agar, potato-carrot agar and Rose Bengal medium. In result of this study 13 unusual cultural variants were obtained, hence there is a necessity in future take into account the received data about them in clinical and laboratory conditions.*

Key words: aspergilli, mutability, colony

* Контактное лицо: Рябинин Игорь Андреевич,
Тел.: (812) 303-51-40

ВВЕДЕНИЕ

Спонтанная и индуцированная морфологическая изменчивость возбудителей микозов – важный аспект, который необходимо учитывать при видовой идентификации изолятов и в физиологических исследованиях. При возрастающей в настоящее время тенденции к использованию молекулярно-генетических методов исследования возбудителей аспергиллеза интерес к морфологическим методам ослабевает. Несмотря на ограниченную точность, изучение макро- и микроморфологии грибов, в частности аспергиллов, является базовой методикой видовой идентификации, доступной в подавляющем большинстве лабораторий. В связи с этим для диагностики аспергиллеза микологу необходимо располагать сведениями о полиморфизме возбудителей этого заболевания.

В определителях аспергиллов (классических и современных) морфологические описания приведены, главным образом, на основе типичных штаммов, выращенных на 1-3 питательных средах. Сведения о некоторых штаммовых вариациях показаны фрагментарно и без подробного иллюстративного сопровождения.

Богатый иллюстративный материал, полученный на основе исследования коллекционных штаммов аспергиллов на различных питательных средах и при разных температурах инкубации, представлен в работах сотрудников Centraalbureau voor Schimmelcultures (Утрехт, Нидерланды) [1, 2]. Однако основное внимание они уделяют видоспецифическим характеристикам, но не изменчивости внутри видов.

Данные о проявлении действия миковирусов в гигантских колониях *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* и *A. clavatus*, в зависимости от состава питательной среды, приведены в труде Журавлевой Н.П. и соавторов [3].

Изменчивость *A. fumigatus* на среде Чапека с дрожжевым экстрактом и связь морфологических признаков с результатами анализа MALDI-TOF-масс-спектров белкового экстракта исследовали Рябинин И.А. и Чилина Г.А. [4].

Zain M.E. и др. (2009) изучили морфологию и некоторые биологические свойства *Aspergillus terreus* и 2-х видов пенициллов на 7 различных питательных средах. Авторы оценивали массу мицелия (сухую и влажную), диаметр и пигментацию колоний, удельную продукцию спор (на 1 см² колонии), а также продукцию 14 вторичных низкомолекулярных метаболитов, включая микотоксины.

Krishnan P.S., Bajaj V. и Damle S.P. (1954) продемонстрировали различные ростовые характеристики у *A. niger* на среде Кури (для получения лимонной кислоты) в зависимости от способа получения и обработки инокуляма спор.

Karnataka J. в своей работе (1993) изучал ростовые характеристики *A. tamarii*. Автор использовал из-

вестные питательные среды (агар с бенгальским розовым, картофельно-глюкозный агар, питательный агар), а также некоторые оригинальные на основе агара с 2% сахарозы и одной из трех добавок: сухой навоз, экстракт из личинок тутового шелкопряда, экстракт из испражнений тутового шелкопряда. Последние 3 среды автор предложил для диагностики аспергиллеза домашнего тутового шелкопряда (*Bombyx mori* L.). Наиболее интенсивный рост наблюдали на среде с экстрактом личинок и сахарозой.

Характеристики колоний *A. niger* изучали Gupta M., Manisha K. и Grover R. (2012). Посевы делали на картофельно-глюкозный агар (классический и с добавками сахарозы и пептона), среду Чапека (в том числе – с добавкой дрожжевого экстракта), лигноцеллюлозный агар.

Ультраструктуру конидий *A. fumigatus*, в зависимости от состава питательной среды, анализировали Lopes L. и соавторы (2007).

В большинстве указанных работ морфологическая изменчивость аспергиллов, очевидно, имела адаптивный характер в связи с приспособлением к составу питательной среды или иным условиям (в том числе – в форме активации миковируса). Но, наряду с адаптивной изменчивостью, не меньший интерес вызывает изменчивость спонтанная, которая может отражать как индивидуальные особенности морфогенеза у конкретного штамма, так и влияние внешних факторов, которые не всегда удается контролировать в работе (сезонные особенности роста, изменения в составе питательной среды при хранении и прочее).

Цель нашей работы – представить данные о необычных культуральных вариантах *Aspergillus* spp. на различных питательных средах, выявленных при сплошном исследовании коллекции штаммов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали штаммы *Aspergillus* spp. клинического происхождения, депонированные в Российской коллекции патогенных грибов и выделенные в НИИ микологического мониторинга и биологии грибов. В статье помещены наблюдения над 13 штаммами, проявившими необычную морфологию колоний, которые были отобраны из рабочей коллекции при изучении морфологических свойств около 60 штаммов различных видов на плотных питательных средах. Все исследованные штаммы прошли видовую идентификацию по морфологическим признакам, а также методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии белкового экстракта согласно протоколу, опубликованному ранее [5]. Кроме того, некоторые штаммы были идентифицированы методом ДНК-сиквенирования по Сэнджеру (Genetic Analyzer 3500, Applied Biosystems, США; в скобках указан locus): *A. niger* РКПГ F-1249 (D1/D2 – регионы, кодирующие рибосомальную РНК большой субъединицы, ген β -тубулина); *A. niger/awamori* РКПГ F-1446 (β -тубулин); *A. awamori* РКПГ F-1444 (β -тубулин);

A. sydowii РКПГ F-1510 (β -тубулин); *A. calidoustus* (β -тубулин). Штамм F-1446 по результатам сиквенирования занимает промежуточное положение между двумя видами, но для краткости далее мы обозначаем его *A. niger* РКПГ F-1446.

Из спор изучаемых штаммов готовили суспензии концентрацией около 10^7 КОЕ/мл, которые засеивали на плотные питательные среды методом одноточечного и трехточечного посева. Инкубацию проводили при 30 °С, сроки инкубации у разных культур подбирали индивидуально – в зависимости от интенсивности развития колоний, они приведены ниже в разделе «результаты исследования». Данная температура инкубации выбрана нами, поскольку она является универсальной для роста, спорообразования и синтеза пигментов у всех представителей рода *Aspergillus*.

Для посева использовали плотные питательные среды: агар Сабуро с 2% глюкозы, классический агар Чапека, агар Чапека с дрожжевым экстрактом, картофельно-глюкозный агар, картофельно-морковный агар, среду с бенгальским розовым (HiMedia, Индия).

Помимо культур, полученных специально, в исследование также включили описания и фотографии колоний из посевов патологического материала на среде Сабуро, выращенных при 37 °С и 28 °С.

Фотосъемку колоний осуществляли камерой Presto T55 (Rekam, Италия). Изображения обрабатывали с помощью графических редакторов XnView 2.04 и GIMP 2.8.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Атипичный вариант *A. niger* на среде с бенгальским розовым.

Агар с бенгальским розовым – питательная среда, применяемая в санитарной микологии (например, для исследования пищевых продуктов) в зарубежной практике. Доступна она и на отечественном рынке, но регламентирующих документов по ее целевому использованию нет. Отличительная особенность среды – способность ограничивать распространение колоний у грибов, обычно проявляющих неограниченный рост, в том числе – многих аспергиллов, что удобно для подсчета колоний при количественном анализе. Типичная форма роста *A. niger* на среде с бенгальским розовым проявляется образованием, спустя 72 ч инкубации при температуре 30 °С, компактных колоний ($\approx 1,5$ см), покрытых конидиальными головками темно-зеленого цвета с ободком золотисто-желтого воздушного мицелия с молодыми конидиеносцами по периферии (Рис. 1А).

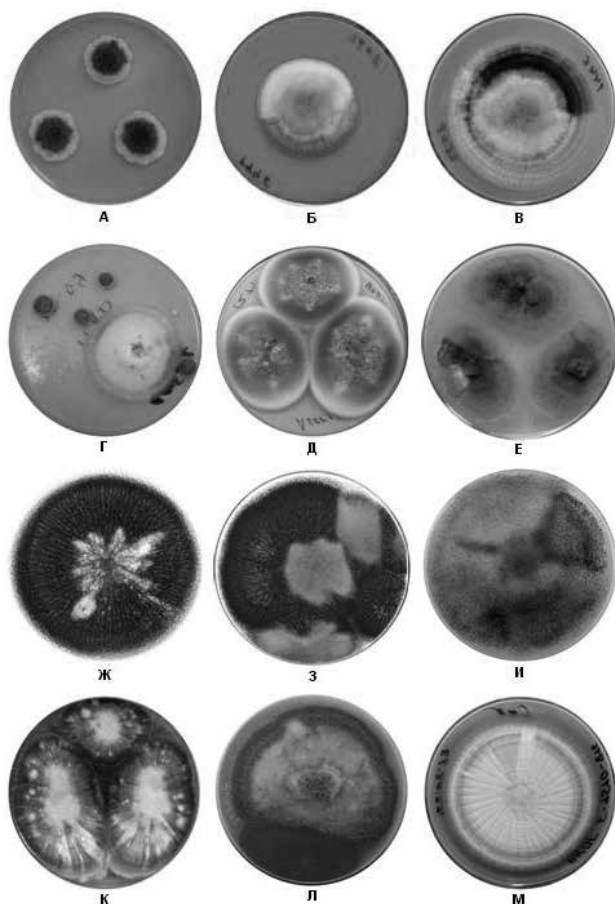


Рис. 1. А – *Aspergillus niger* РКПГ F-1249 на среде с бенгальским розовым; Б, В – *A. niger* РКПГ F-1446 на среде с бенгальским розовым на разных сроках инкубации; Г – *A. calidoustus* на среде Сабуро; Д – *A. calidoustus* на агаре Чапека с дрожжевым экстрактом; Е – *A. calidoustus* на картофельно-морковном агаре; Ж – *A. niger* РКПГ F-1445 на среде Сабуро; З – *A. awamori* РКПГ F-1444 на среде Сабуро; И – *A. niger* РКПГ F-1446 на среде Чапека; К – *A. ustus* на среде Чапека с дрожжевым экстрактом; Л – *A. flavus* на среде Сабуро; М – *A. sydowii* РКПГ F-1510 на среде Сабуро. Сроки инкубации указаны в тексте

Необычно проявил себя на данной среде штамм *A. niger* РКПГ F-1446. После одноточечного посева, спустя 7 суток, видимого роста не наблюдали, а на 12-е сутки сформировалась колония диаметром $\approx 4,5$ см (Рис. 1Б), покрытая на большом протяжении высокой сетью воздушного мицелия ватной консистенции, бело-коричневатого цвета. Но край колонии на протяжении почти половины ее окружности, напротив, покрывал уплощенный субстратный мицелий с отчетливыми радиальными бороздами. Спустя еще 2 суток на поверхности колонии появились конидиальные головки. Единичные крупные черные конидиальные головки наблюдали в центре, а наиболее сильное спороношение происходило в зоне, покрытой уплощенным мицелием – там формировались более типичные для данной среды темно-зеленые головки и желтоватые молодые. Далее рост колонии равномерно увеличился по всему контуру и приобрел зональность. На 17-е сутки со стороны сектора, исходно покрытого плоским мицелием, отмечали

наиболее интенсивное спороношение с образованием черных головок, на остальном протяжении колонии конидиеносцы располагались более разреженно поясом, ближе к центру, более дальние участки были стерильными (Рис. 1В).

Атипичные варианты *A. niger* и *A. awamori* на среде Сабуро.

Штаммы *A. niger* РКПГ F-1445 (Рис. 1Ж) и *A. awamori* РКПГ F-1444 (Рис. 1З) на среде Сабуро, спустя 7 суток инкубации, образуют гигантские колонии с распространением в центре белого тонкого воздушного мицелия в форме облака, оплетающего конидиеносцы. У *A. awamori* он приобретает серый оттенок и при пересеве на другие среды формируется слабо в центре колонии или не образуется вовсе. У штамма *A. niger*, напротив, ватообразная масса белого мицелия стойко формировалась на Сусло-агаре, среде Чапека и картофельно-морковном агаре, но не столь интенсивно, как на среде Сабуро.

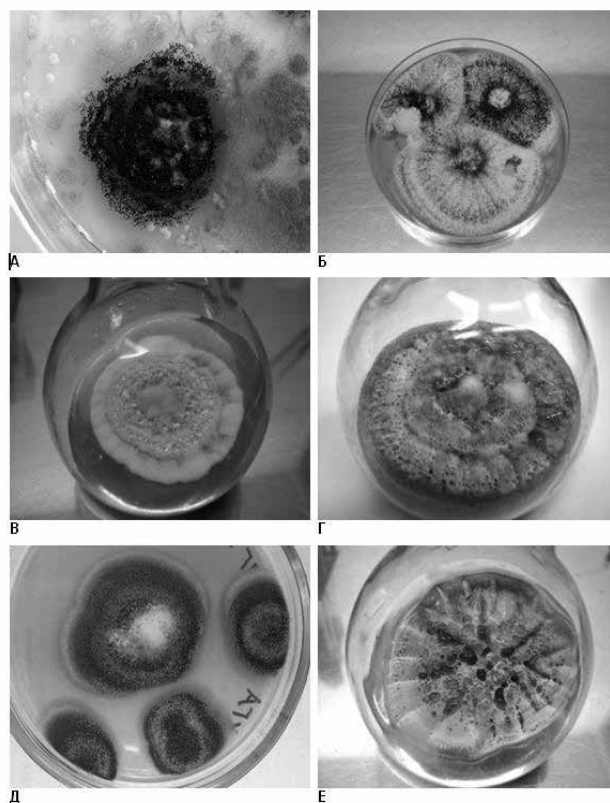


Рис.2. А, Б – 2 штамма *A. niger* на среде Сабуро (диагностические посева); В, Г – *A. ustus* на агаре Чапека с дрожжевым экстрактом на разных сроках инкубации; Д – *A. nidulans* РКПГ F-1336 на картофельно-глюкозном агаре; Е – *A. nidulans* РКПГ F-1336 на среде Чапека с дрожжевым экстрактом. Сроки инкубации указаны в тексте

При наблюдении за ростом штамма *A. niger* в посевах бронхоальвеолярного лаважа при 28 °С, в котором также обнаружили рост *A. fumigatus* и *Candida* sp., выявили 2 колонии с зональной структурой, краями неправильной формы и хорошо выраженным образованием черного цвета мазута, блестящего экссудата в разновеликих каплях (Рис. 2А). Данный при-

знак для вида *A. niger* не является типичным. Билай В.И. и Коваль Э.З. (1988) упоминают об образовании у некоторых штаммов прозрачного мелкокапельного экссудата на среде Чапека, но в наших наблюдениях этот феномен обнаружить не удалось. По-видимому, причиной его возникновения в данном случае стало действие метаболитов двух других микромицетов – при последующих пассажах данного штамма *A. niger* на различных питательных средах экссудат более не появлялся.

В большинстве посевов на среде Сабуро у *A. niger* происходит очень интенсивное спороношение, и субстратный мицелий редко бывает заметен. На рисунке 2Б показан рост штамма *A. niger* в посевах бронхоальвеолярного лаважа спустя 7 суток инкубации при 35 °С из трех точек, у которого колонии отличаются ярким бело-желтым субстратным мицелием, покрытым разреженными конидиеносцами.

Варианты *A. utus* и *A. calidoustus* на среде Чапека с дрожжевым экстрактом.

A. calidoustus – редкий возбудитель аспергиллеза человека из секции *Usti*, впервые описанный Varga J. и соавторами в 2008 г. [6]. Несколько случаев выделения этого микромицета было зарегистрировано в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина. В одном из таких случаев изолят данного вида удалось выделить повторно из бронхоальвеолярного лаважа от одного пациента в нарастающем количестве. Колонии на среде Сабуро были белыми, возвышающимися в центре, с единичными каплями желтого экссудата, а в окружающую часть среды диффундировал лимонно-желтый пигмент (Рис. 1Г). После пересева на среду Чапека с дрожжевым экстрактом штамм, спустя 5 суток инкубации при 30 °С, образовал бархатистые светло-серые колонии, что соответствует типовому описанию. Отличительной особенностью была продукция большого количества янтарно-оранжевого экссудата в крупных каплях (Рис. 1Д). Как в оригинальном описании Varga J. и соавторов, так и в обзоре по секции *Usti*, подготовленном Houbraeken J. и соавторами [7], упоминается образование экссудата у *A. calidoustus* на этой среде, но в мелких каплях желто-коричневого цвета. На иллюстрациях, которыми авторы этих статей подкрепили описания, капли экссудата различимы с трудом, образуются колониями в скудном количестве и имеют гораздо менее яркий цвет. При последующих пересевах данный признак оказался нестойким и, если возникал, то больше соответствовал «типовому» описанию, чем первоначальной картине.

У *A. ustus*, несмотря на значительно большую историю его изучения, чем у предыдущего вида, характеристики роста штаммов на среде Чапека с дрожжевым экстрактом в различных определителях приводят не вполне подробно. Изученный нами штамм выделен из мокроты. В первом посеве на данную среду образовал распространенные колонии, которые по цветовой гамме приближались к колони-

ям штамма из Centraalbureau voor Schimmelcultures [7], но структура колонии отличалась. Молодые колонии, спустя 5 суток инкубации при 30 °С, сначала желтые, затем из-за интенсивного спороношения по периферии коричневеют и выделяют обильный светло-желтый экссудат. Центр колонии остается желтым. Обращает на себя внимание сложный сетчатый рисунок колонии. На 10-е сутки экссудат на большем протяжении исчезает, на его месте появляются облаковидные образования из стерильного воздушного мицелия (Рис. 1К).

После хранения на картофельно-морковном агаре на протяжении 5 месяцев при комнатной температуре, в новом пересеве на агаризованную среду Чапека с дрожжевым экстрактом, колония этого штамма сформировалась иначе (в этот раз посев провели в колбу на скошенный слой среды). В центре образовалось беловато-серое возвышение ватобразной консистенции из воздушного мицелия. Колония имела зональную структуру – в ней образовывались глубокие концентрические борозды. Даже спустя 15 суток инкубации спороношение было слабым, колония сохраняла беловатый цвет; наблюдали чрезвычайно интенсивное образование экссудата, который формировался в крупных неправильной формы каплях и сливался с колонии (Рис. 2В). Только к 20-м суткам инкубации, после того, как экссудат стал подсыхать, в культуре началось спороношение, и она приобрела сероватый цвет, характерный для вида. На месте капель экссудата появились углубления неправильной формы так, что поверхность колонии приобрела рельеф «ноздреватого сыра» (Рис. 2Г).

Ни один из приведенных штаммов на среде Чапека с дрожжевым экстрактом не образовывал типичных для секции *Usti* клеток Хюлле.

***A. calidoustus* на картофельно-морковном агаре.**

Описание роста *A. calidoustus* на данной питательной среде мы приводим впервые. Рост довольно быстрый. Посев спустя 7 суток инкубации при 30 °С представлен на рисунке 1Е. Колонии тускло-зеленого цвета с неправильными очертаниями, в центре – несколько возвышенные и с более интенсивным спорообразованием, в периферийной части колонии воздушный мицелий более рыхлый, конидиеносцы расположены реже. Отдельными участками в центральной зоне, а также обрамляя края колонии, располагается белый воздушный мицелий. Экссудат культура на этой среде не выделяет. Обратная сторона колоний неравномерно окрашена диффундирующим пигментом в зеленовато-желтый цвет.

Вариант *A. sydowii* на среде Сабуро.

Для этого вида типичным считают образование бархатистых колоний бирюзово-зеленого цвета с хорошим спороношением. При пассаже штамма *A. sydowii* РКПГ F-1510/816 (посев в одну точку) и инкубации при 30 °С в течение 10 суток гигантская

колония сформировалась без выраженного спороношения с хорошо заметным рельефом из радиальных и кольцевых борозд. Только на 14-15-е сутки по периферии колонии образовался пояс, покрытый конидиеносцами (Рис. 1М).

Варианты *A. flavus* на среде Сабуро.

Типичные штаммы *A. flavus* на среде Сабуро образуют светло-зеленые бархатистые колонии и отличаются обильным спороношением. При пересеве штамма *A. flavus*, выделенного из ликвора, спустя 6 суток инкубации при 30 °С он образовал гигантскую колонию, приподнятую в центре и покрытую белым воздушным мицелием без конидиеносцев. Случайно образовавшаяся при посеве мелкая краевая колония была по строению более типичной для данного вида. На 8-9 сутки с края гигантской колонии к центру начали появляться высокие конидиеносцы (Рис. 1А), которые на 10-11 сутки покрыли всю колонию. Интересно, что в исходном посеве ликвора у данного штамма не наблюдали такой характер спороношения. Аналогичное поведение изолятов данного вида нам удалось обнаружить в двух посевах мокроты.

Вариант *A. niger* на агаре Чапека.

Штамм *A. niger* РКПГ F-1446 после однократно-го пассажа на среду Чапека, спустя 7 суток инкубации при 30 °С, образовал гигантскую колонию с неравномерным рельефом. На большем протяжении колонии конидиеносцы были погружены в рыхлый белый, местами – серовато-коричневый воздушный мицелий, на $\frac{3}{4}$ поверхности колонии конидиеносцы расположены неравномерно. Один из секторов колонии (чуть менее $\frac{1}{3}$) был плотно покрыт конидиеносцами, и на его поверхности не было обильного воздушного мицелия (Рис. 1И). Это сектор также выделялся и на оборотной стороне – субстратный мицелий в нем оказался слабо развит, поэтому реверзум был темной окраски за счет пигментации спор; в других областях колонии наблюдали реверзум оттенков белого. Как видно из описания, данный штамм проявил рост, схожий с приведенным выше на среде с бенгальским розовым.

Изменчивость *Emericella nidulans* в серии пассажей на различные среды.

Штамм *A. nidulans* РКПГ F-1336 с картофельно-морковного агара, на котором он поддерживается в Российской коллекции патогенных грибов, осенью 2012 г. переселили на картофельно-глюкозный агар с добавлением 0,3% дрожжевого экстракта. Во время инкубации при 30 °С, спустя 5 суток, штамм образовал на этой среде компактные колонии зеленовато-серого цвета с возвышающимся белым воздушным мицелием в центре и темно-каштановым реверзмом. Спустя 10 суток колонии увеличились в размерах, воздушный мицелий приобрел характерный изумрудно-зеленый цвет, в колониях начали зонально образовываться ярко-желтые клейстотеции (Рис.

2Д). При обнаружении признаков полового процесса, согласно классической микологической номенклатуре, данную культуру правильнее именовать родовым именем *Emericella*. В современной микологической номенклатуре положен путь к унификации названий грибов, но для данного вида пока не избрано единое родовое имя. После этого штамм поддерживали на данной среде, а затем – на агаре Чапека с дрожжевым экстрактом с целью демонстрации на учебном процессе. В результате многократных пассажей штамм стал образовывать светло-желтые зернистые колонии, почти сплошь покрытые клейстотециями, а участки типичного воздушного мицелия, обусловленные скоплением конидиеносцев, стали появляться нерегулярно только в краевой части некоторых колоний. При посеве на скошенную среду Чапека с дрожжевым экстрактом в колбу и инкубации при 30 °С, спустя 10 суток, образовалась колония, по строению сходная с последним описанием, но отличающаяся образованием большого количества эксудата чайного цвета в разновеликих каплях (Рис. 2Е). Хотя приведенные признаки не являются атипичными для *E. nidulans*, мы поместили здесь описание данного штамма, поскольку интересна изменчивость его колоний в серии пересевов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные о необычных вариантах *Aspergillus* spp. обогащают представления о полиморфизме представителей данного вида. Морфологические особенности различных видов аспергиллов, приведенные нами, очевидно, имеют многофакторное происхождение. Они могли быть связаны с индивидуальными особенностями генома, определяющими биосинтез компонентов клеточной стенки, процессы ветвления гиф, спорообразование, синтеза пигментов, а также интенсивность энергетического и пластического обменов. Поскольку микробиологическая питательная среда для аспергиллов является искусственной, случайной средой обитания, у свежесделанных на ней штаммов не следует искать появления «глубоких» приспособительных механизмов. В то же время, при длительном музейном хранении штаммов на питательных средах можно добиться появления стойкой адаптации, позволяющей грибу оптимально использовать питательные субстраты среды, нивелировать действие собственных токсичных метаболитов и максимально длительно сохранять жизнеспособность. Но такого эффекта можно добиться только с использованием приемов селекции, питательных сред стандартного состава и фиксированных сроков пересева.

Из причин полиморфизма не следует исключать также возможное сигнальное действие некоторых компонентов питательных сред или их производных, образующихся в результате биотрансформации.

Механизмы стойкой изменчивости у грибов связаны не только с генетическими, «ядерными», но «цитоплазматическими», протеомными факторами,

поскольку как в природных, так и в лабораторных условиях у подавляющего большинства медицински значимых видов доминирует вегетативный путь образования новых колоний.

Длительное время считали, что проявление морфологической изменчивости в культуре является исключительно лабораторным феноменом, изучение которого позволяет оптимизировать только процесс морфологической идентификации. С внедрением экспертных приемов идентификации, включая парциальное ДНК-сиквенирование и MALDI-TOF-масс-спектрометрию белкового экстракта, интерес к полиморфизму возбудителей микозов в медицинской микологии существенно угас. Однако в последние годы появились работы, в которых показана связь биосинтеза некоторых факторов вирулентности аспергиллов (гидрофобин, меланина, системы захвата ионов Zn^{+2}) с особенностями роста культуры [8-10]. В связи с этим необходима разработка технологий биочипирования, позволяющих быстро и

комплексно определять у изолятов возбудителей микозов видоспецифичные признаки (для целей идентификации); конституциональные и индуцибельные факторы патогенности (включая связанные с морфогенезом), а также факторы резистентности к антимикотикам. Возможно, внедрение таких технологий позволит проводить скрининговый отбор по морфологическим признакам изолятов, обладающих биологическими свойствами, представляющими ценность для клинициста.

Авторы выражают благодарность лабораторному микологу, к.м.н. Ю.А. Сухановой за предоставление штамма *A. ustus*.

Работа выполнена при поддержке гранта «УМ-НИК» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор № 0005783) и гранта им. профессора Э.Э. Эйхвальда.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Samson R.A., et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli// Studies in Mycology. – 2007. – Vol. 59. – P. 129-145.
2. Samson R.A., et al. New species in *Aspergillus* section Terrei// Studies in Mycology. – 2011. – Vol. 69. – P. 39-55.
3. Журавлева Н.П., Елинов Н.П., Васильева Н.В., Босак И.А. Выявление литического фактора у штаммов микромицетов – продуцентов аллергенов// Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т. 15, №1. – С. 40-48.
4. Рябинин И.А., Чилина Г.А. Связь результатов MALDI-TOF-масс-спектрометрии с культуральными свойствами *Aspergillus fumigatus*// Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №2. – С. 120.
5. Рябинин И.А. и др. Выявление родственных связей у клинических изолятов *Aspergillus fumigatus* Fres. и *A. niger* v. Tiegh посредством анализа масс-спектров их протеомов// Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16, №1. – С. 50-56.
6. Varga J., et al. *Aspergillus calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus*// Eukaryotic Cell. – 2008. – Vol. 7, №4. – P. 630-638.
7. Houbraken J., et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Usti// Studies in Mycology. – 2007. – Vol. 59. – P. 107-128.
8. Amich J., et al. The ZrfC alkaline zinc transporter is required for *Aspergillus fumigatus* virulence and its growth in the presence of the Zn/Mn-chelating protein calprotectin. 6th advances against aspergillosis. Abstract book. – 2014. – P. 219.
9. Beauvais A. *Aspergillus* cell wall and biofilm. 6th Advances against aspergillosis. Abstract book. – 2014. – P. 34.
10. Juvvadi P.R. Hyphal growth and septation. 6th Advances against aspergillosis. Abstract book. – 2014. – P. 35.

Поступила в редакцию журнала 27.11.2014

Рецензент: И.А. Босак



SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF BIOFILM ON URETHRAL AND VENOUS CATHETERS

**Stepanova A.A.* (head of the laboratory),
Vasilyeva N.V. (director of the institute,
head of the chair), Pinegina O.N. (assistant
lecturer of the chair)**

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

©Collective of authors, 2014

The data about the ultrastructural organization of the biofilms formed on different type of catheters (5 urethral and 3 venous) of the patients with various disease and during different exposition (time of using) have been presented in this article. Catheters were examined by microbiological methods for revealing the bacterial and fungal biodiversity and electron microscopically. We demonstrated, that in the surfaces of the urethral catheters, in comparison with venous, were formed more massive biofilms. Assumed, that the functionally biofilms «may scan and repro-duce» the character of texture of the solid catheter surface.

Key words: biofilm, *Candida* species, catheter-associated infections *in vivo*, scanning electron microscopy, ultrastructure

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОПЛЕНОК УРЕТРАЛЬНЫХ И ВЕНОЗНЫХ КАТЕТЕРОВ

**Степанова А.А. (зав. лаб.), Васильева Н.В. (директор института, зав. кафедрой),
Пинегина О.Н. (ассистент кафедры)**

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

©Коллектив авторов, 2014

В статье представлены данные об ультраструктурной организации биопленок, формируемых на различных типах катетеров (5 уретральных и 3 венозных) у пациентов с различными заболеваниями и длительностью катетеризации. Изучали видовой состав микроорганизмов, образующих биопленки, а также морфобиологические особенности биопленок методом сканирующей электронной микроскопии. Нами показано, что на поверхности уретральных катетеров, по сравнению с венозными, были сформированы более массивные биопленки; предположено, что функ-

ционально биопленки, возможно, «могут сканировать и воспроизводить» характер текстуры твердой поверхности катетера.

Ключевые слова: биопленки, *in vivo*, *Candida* species, катетер-ассоциированные инфекции, сканирующая электронная микроскопия, ультраструктура

INTRODUCTION

Catheter biofilms represent the highly organized association of the microorganisms and the extracellular products of their vital functions, which form a structured community on the solid surface. The biofilms formation dangerous with catheter-associated infections. Bacteria and fungi which pass into the urinary tract and the blood circulatory system from the lumen of the catheter cause complications in the patients disease. The medical consequences of device-related infections can be disastrous; they include potentially life-threatening systemic infections and device malfunction that may require device removal [1]. Data about the micromorphology of biofilms, which *in vivo* formed on human catheters, few in number [2, 3; Ganderton L., et al. //Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1992. – Vol. 11, №9; Marrie T.J., Costerton J.W. //J. of Clin. Microbiol. – 1984. – Vol. 19, №5; Gorman S.P., et al. //Epidemiol. Infect. – 1994. – Vol. 112. and etc.]. The aim of the present work was the trace the relationship between ultrastructural and microbiological variability of clinical catheter-related infections.

MATERIALS AND METHODS

A total of 8 catheter tips from 7 patients were included in the present study. All data about investigated samples, time of the catheter standing and isolated species have been included in the table. The urethral catheters were produced from siliconized latex (Unomedical, Denmark) and the venous from polyurethane (BBraun, Germany).

Table

The description of investigated samples			
№	Patients, their age and disease	The time of the catheter using	Isolated microorganisms
Urethral catheter			
1	C., 54 years; spontaneous esophageal perforation	7 days	<i>Candida albicans</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	K., 63 years; biliary peritonitis	7 days	<i>C. albicans</i> , <i>K. pneumoniae</i>
3	N, 82 years; gastrointestinal passage of blood	3 days	<i>C. albicans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4	C., 56 years; fecal peritonitis	7 days	<i>K. pneumoniae</i> , <i>Corinebacterium amyloletum</i>
5	B., 57 years; soldering disease	6 days	<i>K. pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Venous catheter			
1	I., 60 years; heart attack	10 days	<i>C. albicans</i> , <i>K. pneumoniae</i>
2	N., 82 years; gastrointestinal passage of blood	3 days	Grows absent
3	S., 57 years; acute peritonitis	25 days	<i>K. pneumoniae</i>

Isolation of microorganisms from catheters.

The distal (5 cm) part of the catheters were cut from the entire catheter length and the one segment (up to 2 cm) was placed in a tube with 1 ml of 0,9% NaCl,

* Контактное лицо: Степанова Амалия Аркадьевна, тел.: (812) 303-51-40

which was then vortexed for 1 min. Afterwards, 0.1 ml of the suspension was spread onto blood agar and Sabouraud dextrose agar plates. Plates were incubated for 48 h at 37 °C and 28 °C aerobically. Isolated bacteria and yeasts were identified with MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonik GmbH).

Scanning electron microscopic investigations (SEM).

The distal part of the catheter was further cut perpendicular to the catheter length with the blade into 2- to 3 mm-long «doughnut» segments. The catheter segments was fixed in 3% glutaraldehyde (on 061 M cacodylate buffer) for 3 hour, post-fixed overnight in 1% osmium tetroxide in same buffer, dehydrated by ethanol series, critical-point dried (HCP-2) for 15 min, coated with gold and observed in JSM 35 (JEOL, Tokyo, Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

From 8 investigated catheters in 4 (50%) we isolated fungi and bacteria, but in remain samples – only bacteria. In all cases fungi was present only one species – *C. albicans*. In 2 cases of urethral catheters *C. albicans* was isolated in combination with *K. pneumonia* and in one – with *P. aeruginosa*. The venous catheters were a major reservoir and source for *Candida* species bloodstream infections in hospitalized patients [4]. According the date in literature the urethral catheters can be colonized also by single bacterial species [Ganderton L., et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1992. – Vol. 11, №9]. We isolated *P. aeruginosa* only in 1 from 5 studied urethral catheters. As reported Ohkawa M. with co-authors [Ohkawa M., et al. // J. Urol. – 1990. – Vol. 143], this last species often isolated from urethral silicone catheters.

From all studied catheters surfaces, with the exception of 1 venous, we isolated *K. pneumonia*. Among the investigated samples dominate the 2 mixed-species biofilms with *K. pneumonia*.

Urethral catheters. Notice, that under SEM the outer surface of **control** sterile samples (before using, without biofilms) of the urethral catheter have the stable slightly folded specific tiled texture (Fig. 1 a). The surface of catheter's lumen was smooth. On the longitudinal catheter section we may see presence of 2-wo distinct layers: upper more thin (from 1,8 to 2,7 μm) covering (Fig. 1 b, 1) and the remaining more thick part (Fig. 1 b, 2). The material of upper part with more lower contrast, irregular in form and lower – with more high electron density and horizontally localized layers.

Catheter 1. On the outer surface of catheter was visible the presence of biofilm (from 5 to 10 μm) with specific «tiled picture» (Fig. 1 c, arrow) look like the same tiled texture of control one, but more relief. Under higher magnification it was obvious the presence of crack (Fig. 1 d, double arrows) and single spherical cells (Fig. 1 e, arrow), which according its dimensions (5,0 x 6,0 μm) were similar with *C. albicans*. At the smooth sur-

face (Fig. 1 e, arrow) of internal gleam of analyzed catheter we revealed thick (20,0 μm) good developed biofilm (Fig. 1 f), with 2 good distinguishable borders. The «picture» of the outer surface of this biofilm not similar with outer one and have tiled character (Fig. 1 f, double arrows). On the internal catheter's surfaces of biofilm we revealed only massive aggregation of cells (Fig. 1, arrow), which according of its morphology (Fig. 1 g, arrows) and sizes (2,5 x 4,5 μm) possible identify as *Malassezia* spp.

Catheter 2. On this catheter we revealed biofilm (2.5 μm) only on upper surface (Fig. 1 h, arrow), which sculpture (Fig. 1 i) was similar with 2nd samples, which described before. The individual elements of this biofilm was distinguishable due to the fact that they perimeter were lined with cracks (Fig. 1 j, arrows). Under the higher magnification of SEM on the surface of this biofilm we observed the presence of irregular slime-like fine-spumous surface texture, in which possible recognized baculiform cells, typical for *K. pneumonia* (Fig. 1 k, arrow).

Catheter 3. On longitudinal section clear visible that the wall of himself catheter consist from tightly localized vertical layers (Fig. 1 l, arrow). The biofilms we observed on outer and internal lumen surfaces. They both very good developed and significantly differ according the ultrastructure. As it was evident, the texture biofilm, which localized on outer surface significantly differ from before described sample (catheter 2). This biofilm more thick (from 13,0 to 20,0 μm), with good expressed and deep parallel about each other crack (Fig. 1 m, n, arrows). Under the higher magnification of SEM, on its surface possible see abundant aggregation of extended cells (Fig. 1 o, arrows), which morphologically were similar with *P. aeruginosa*. For catheter's lumen (Fig. 1 p) was typical presence of more thin (from 4 to 5 μm) biofilm with specific texture and often crystalline inclusions (Fig. 1 q). Sometimes possible observed semi-submerged spherical cells (Fig. 1 q, arrow) which, perhaps, possible identify as *C. albicans* according with their morphology, size (4,0-5,5 x 6,0-6,5) and microbiological data.

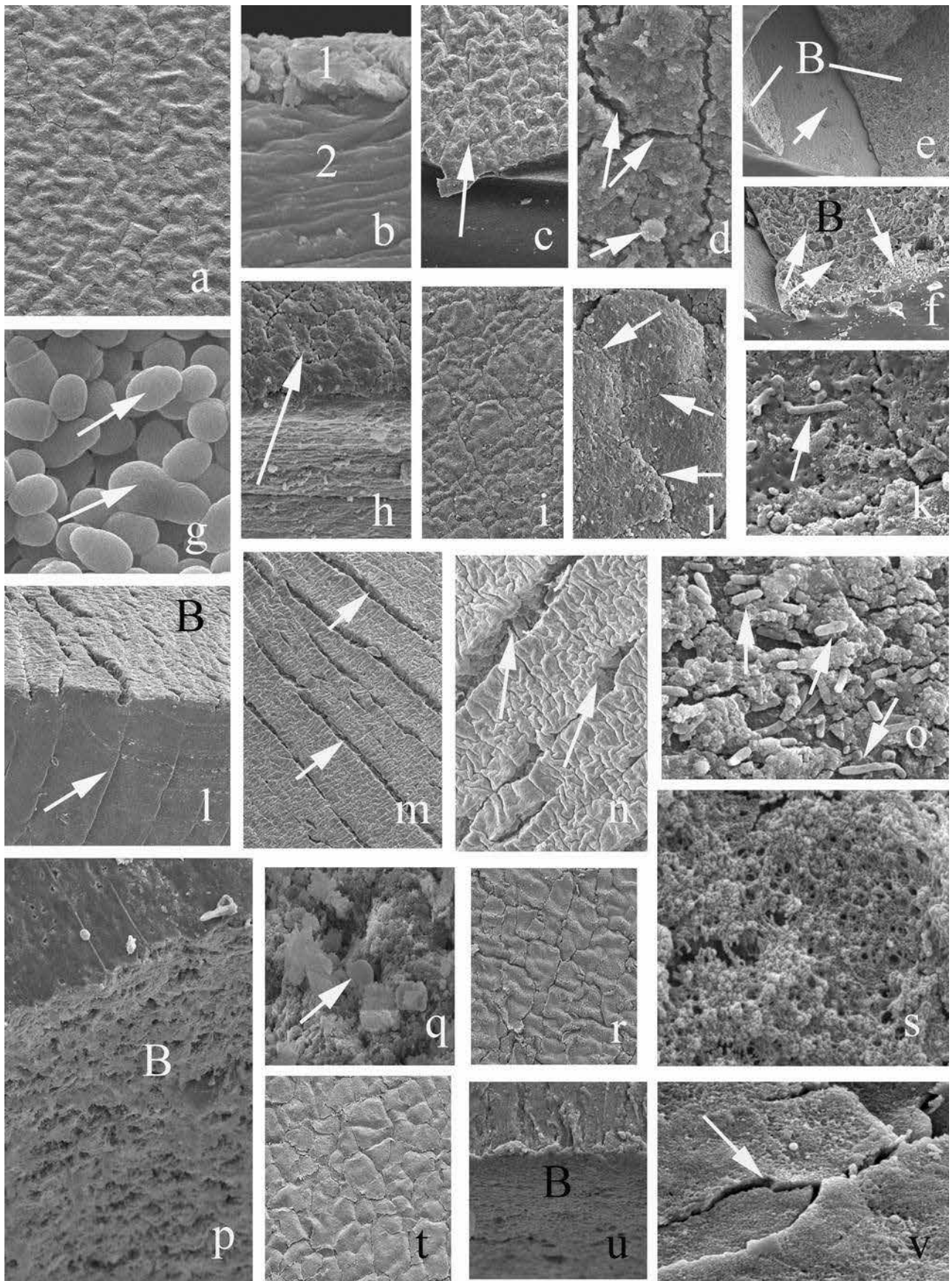


Fig. 1. SEM electronnograms of the surfaces of urethral catheters. Numerations on *b* demonstrated the layers on the catheters wall. Scale : a-f, h-j, l-n, p-v – x10000; g, k, o – x30000

Catheter 4. In this catheter biofilm completely cover upper surface and lumen. Biofilm (from 5 to 10 μm) on outer surface posses with tiled texture (Fig. 2 r). In contrast, the biofilm in catheter's lumen surface was more flat, but with specific reticular organization (Fig. 2 s). We not revealed the profile of bacterial or fungal cells on the on both catheter's surface.

Catheter 5. On these samples, we revealed biofilm on both upper catheter's surface and in lumen. Biofilm on upper catheter's surface was thin (from 2 to 4 μm) and with regular tiled surfaces (Fig. 2 t). On the periphery of the tiled elements clear visible cracks (Fig. 1 v, arrow). The biofilm on lumen surface (Fig. 1 u) with fine-granular (Fig. 1 v) texture. The images of bacterial cells on the biofilm surfaces were absent.

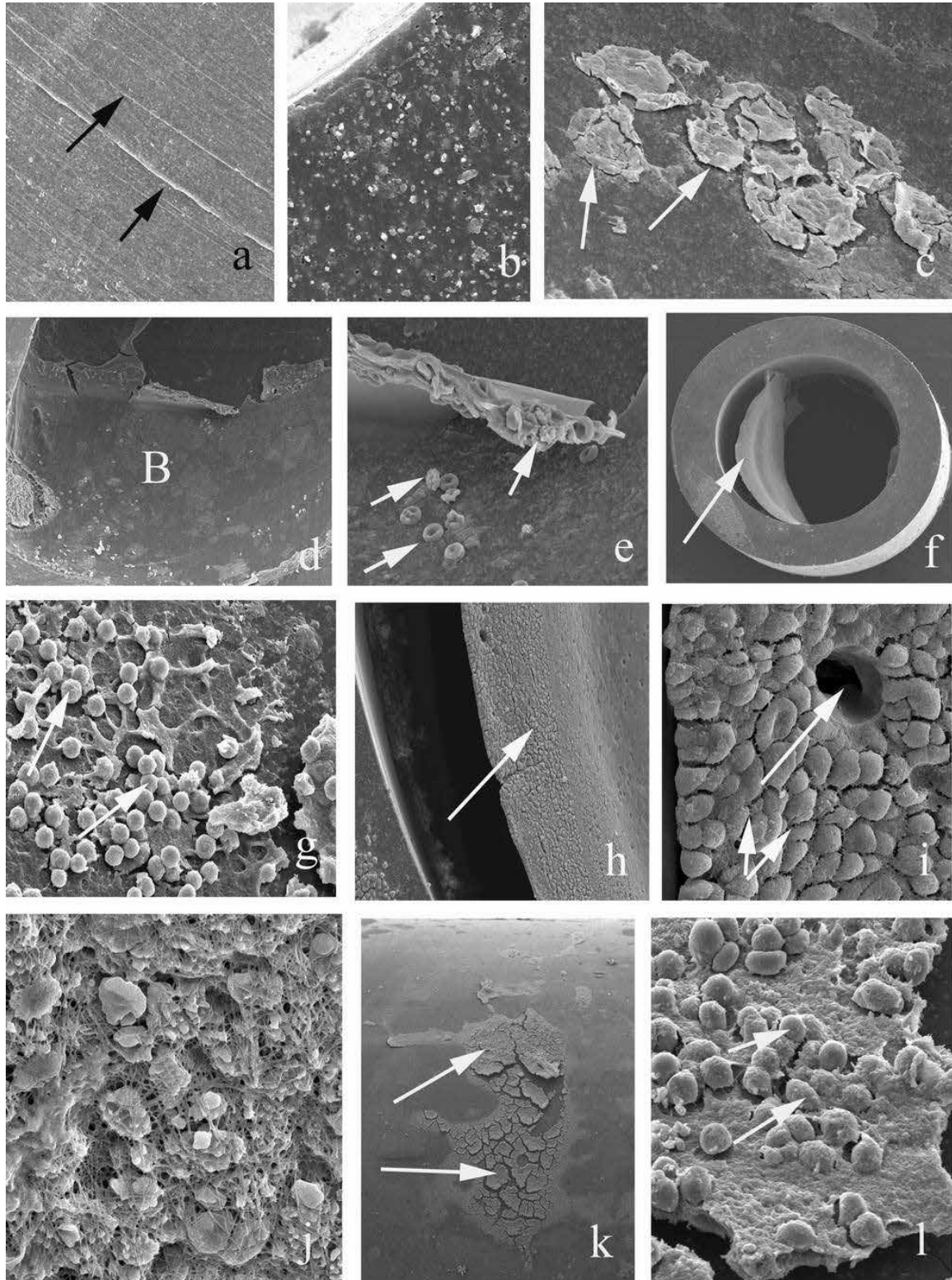


Fig. 2. The general view and fragments of the venous catheters surfaces.
Scale: a, b, k - x 10000; c, d, e, g, j - x 15000; f - x 3000; h - 12000; i, l - x 25000

Venous catheters. The outer surface of **control** sterile catheter's samples under SEM, contrary with urethral one, was smooth with rare small and parallel oriented each other folders (Fig. 2 a, arrows). The same outer surface texture was revealed Marrie S. J. with co-authors [2] in sterile unused intravenous catheter. On the longitudinal catheter section visible not uniform «fine-vesicular» internal structure of the catheter's wall (Fig. 2 b). In was obvious, that the venous catheter in contrast with urethral, have not special outer clear distinguishable cover.

Catheter 1. On the outer catheter's surface we revealed only one large-sized (40,0 x 150,0 μm) discrete biofilm (Fig. 2 c, arrows) and one small-sizes (12,0x12,0 μm) scales. In both cases the biofilms were very thin (from 2 to 3 μm). The first scale presents the aggregation of the separated small ones. In the lumen of catheter we observed the biofilm-like formation (Fig. 2 d, c) with thickness from 5 to 10 μm , which outside and inside contain the groups of blood's elements. In the biofilms of both surfaces of this catheter the bacterial and fungal cells we not revealed.

Catheter 2. Despite the fact that from this catheter we not isolated microorganisms, the biofilms were good developed on both surfaces. Biofilm on the outer surface of the catheter consist from the slime-like matrix (from 2 to 3 μm , Fig. 2 g) with reticulate texture of surface, in which were immersed the spherical (5,0-6,0 μm) or slightly elongated (5x6 μm) numerous single or in small groups cell (Fig. 2 g, arrows). The surfaces of revealed cells were cover with slime-like material. The similar morphology of the extracellular matrix was revealed in composition of venous catheter's biofilm with other authors [2]. In a whole, the thickness of outer biofilm varied from 6 to 7 μm . We revealed good developed falciform biofilm on the lumen of catheter (Fig. 2 f), which thickness in central part was equal 125,0 μm . Under the higher magnification of SEM, it was clear visible differences in the surface texture of the internal (in lumen) biofilm (Fig. 2 h). The longitudinal surfaces of last composed from tightly localized spherical or slightly elongated profiles of cells (Fig. 2), which according the sizes and form comparable with the same on composition of outer biofilm. The cells were covered with homogeneous slime-like material, in which possible recognized the holes (from 5 to 10 μm , Fig. 2 l, single arrow). Among the cells possible recognized the thin short bands (Fig. 2 i, double arrows) of slime. The biofilm's surface, which reverses in the lumen (Fig. 2 j) be astonished with its texture comparable with pattern of «high architecture»: variable in size and form inclusions «wind» with thing lengthy bands of slime. Thus, in this samples the cellular composition, perhaps, were the same in both catheters surfaces. We suggest that it was the yeast cells of the *Candida* spp. The affect the fact, that using of blade for cutting of samples not «cut» the cells of biofilm. This fact indicates evidence of protective function of slime in composition of biofilm matrix. Perhaps, the «highly organized architecture» of solid biofilm construction of these samples to prevent its

destruction during the using of shaker and as a result, the absence of growth.

Catheter 3. In this catheter we find the biofilm only on upper surface. According the general macro- and microstructure, the last (Fig. 2 k) was similar with the same, described for previous samples, but they was thicker (from 8 to 10 μm). The biofilm matrix was also thicker, in contrast with the same of previous catheter, and its surfaces was more smooth and with fine-reticular structure (Fig. 2 l). In slime matrix were immersed the numerous spherical (4,5-5,0 μm) or elongated cells (4,5 x 6,0 μm). In a whole, it was more mature type of biofilm (25 days after using of this venous catheter).

RESUME

Microbiological investigations show, that among the analyzed samples dominate the mixed-species biofilms. Electron microscopic data demonstrate, that in the outer surfaces of the urethral catheters, in comparison with venous, were formed more massive biofilms. This fact we associate with the presence of roughness on its outer surfaces. It was very similar the character of outer surface biofilms texture in 1st and 2nd urethral catheters from which we isolated identical microorganisms (*C. albicans* and *K. pneumonia*). The surface texture of 3rd urethral catheter (combination of *C. albicans* and *P. aeruginosa*) differ significantly from another one and «reproduce» also the longitudinal irregularities in wall of these samples. It was obvious the special peculiarity in the biofilms of outer surfaces of 4th and 5th urethral catheters from which we have not fungal sowing, but together with *K. pneumonia* we isolated the another species of bacteria – *C. amyloatum* and *S. haemoliticus*. On more smooth, outer venous catheter surface we revealed more small discrete biofilms, composed from several scales. The general pattern of biofilms texture of 1st and 2nd venous catheters was practically the same. This biofilms was thin and occupy the small area in comparison with time of their using (respectively 10 and 25 days). Very indicative the 2nd venous catheter, which demonstrated the good developed biofilms on both samples surfaces in the absence of sowing. Undoubtedly, that on the biofilm microbiological composition effect the differences in the chemical composition of its materials, also internal and external liquids, which surround they and the composition of drugs from which the used. Opinion of Anaissie E., et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1995. – Vol. 14, Iss. 2., that the extent of biofilm formation was unrelated to the clinical status, was fully conforming to our data.

Inconceivable, but it was obvious, that the fungal-bacterial biofilms «able the scan and reproduce» the character of solid catheter surfaces.

In investigated in present work biofilms bacterial and fungal cells immersed in slime-like matrix. As decided several authors [Nickel J.C., et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1985. – Vol. 27; Jensen E.T., et al. // Infect. Imm. – 1990. – Vol. 58], this last fact increased the resistance of biofilms to antibiotics, antisept-

tics and host defense mechanisms in contrast with cells growing in suspension. Thus, actually searching the new materials for catheters production. Finally, it was obvious, that during this process exactly necessary preliminary combined microbiological and SEM investigations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors were grateful to main specialist of the Center of Collective Equipment Using of the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences Karceva L.A. for technical assistance during samples preparation and SEM exploiting.

REFERENCES

1. *Kojic E.M., Darouiche R.O. Candida infections of medical devices // Clin. Microbiol. Rev. – 2004 – Vol. 17, №2. – P. 255-267.*
2. *Ahmad I., Khan M.S.A. Microscopy in mycological research with especial reference to ultrastructures and biofilm studies // Curr. Microscopy Contrib. to Advances and Technology. – 2012. – P. 646-659.*
3. *Andes D., Nett J., Oschel P, et al. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model // Infect. Immun. – 2004. – Vol. 72, №10. – P. 6023-6031.*
4. *Ramage G., Rajendran R., Sherry L., Williams C. Fungal biofilm resistance // Int. J. of Microbiol. – 2011. – Vol. 2012. – P. 528521.*

Поступила в редакцию журнала 03.12.2014

Рецензент: М.А. Шевяков



НАКОПЛЕНИЕ ОПАСНЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В ЗОНЕ ВЛИЯНИЯ АВТОМАГИСТРАЛИ «ДОН»

¹Свистова И.Д. (профессор кафедры);

²Корецкая И.И.* (доцент кафедры)

Воронежский государственный педагогический университет: ¹ кафедра биологии растений и животных; ² кафедра биологического образования, Воронеж, Россия

© Свистова И.Д., Корецкая И.И., 2014

В статье представлены данные по обнаружению нарушений в составе и структуре комплекса микромицетов чернозема, подверженных интенсивной автотранспортной нагрузкой в зоне влияния автомагистрали «Дон». Вблизи автотрассы снижается численность грибов, комплекс почвенных микромицетов обедняется, изменяется его видовой состав, накапливаются токсигенные, условно-патогенные и аллергенные виды грибов, что представляет опасность для здоровья людей.

Ключевые слова: биоиндикация почв; микромицеты; токсигенные, оппортунистические и аллергенные виды

THE ACCUMULATION OF DANGEROUS SOIL MICROMYCETES TO HUMANS IN THE ZONE OF INFLUENCE OF THE HIGHWAY «DON»

¹Svistova I.D. (professor of the chair),

²Koretskaja I.I. (associate professor of the chair)

Voronezh State Pedagogical University: ¹ chair of biology of plants and animals; ² chair of biological education, Voronezh, Russia

© Svistova I.D., Koretskaja I.I., 2014

Data on the detection of violations in the composition and structure of the complex of soil micromycetes, are subject by intense road traffic in the zone of influence of the highway «Don» have been presented in the article. Near the highway decreases the population of fungi, depleted the complex soil of micromycetes, changes the species composition, accumulated toxigenic, conditionally pathogenic and allergenic fungi species that is harmful to people's health.

Key words: bioindication of soil; micromycetes; toxigenic, opportunistic and allergenic species

* Контактное лицо: Корецкая Инна Ивановна,
e-mail: innakoreckaja@rambler.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы расширяются исследования по биоиндикации почв [1]. Важной частью почвенного микробного сообщества являются микроскопические грибы. Рядом авторов установлено, что состав и структура комплекса микромицетов может служить информативным параметром биоиндикации почв [2, 3]. Недавно в Федеральный государственный реестр методик, допущенных для целей государственного экологического контроля, внесена новая методика «Биодиагностика состояния почвы с использованием водорослей, цианобактерий и микромицетов» [4].

Среди почвенных микромицетов многие виды представляют серьезную угрозу для здоровья человека. У людей с пониженным иммунным статусом потенциально патогенные (оппортунистические) грибы могут вызывать микозы [5], доказано значение микогенной сенсбилизации в патогенезе аллергических заболеваний [Марфенина О.Е. // Проблемы мед. микологии. – 2002. – Т. 4, №2]. Серьезную проблему представляют также микотоксикозы, связанные с накоплением грибных токсинов в растениеводческой продукции [Елинов Н.П. // Проблемы мед. микологии. – 2002. – Т. 4, №3].

Ранее было показано, что в условиях интенсивной урбаногенной нагрузки городские почвы могут быть резервуаром санитарно-опасных микромицетов [6; Марфенина О.Е. и др. // Микология и фитопатология. – 2002. – Т. 36, №4]. Наиболее нарушен комплекс микромицетов вблизи транспортных развязок, так как почвы, подверженные автотранспортной нагрузке, загрязнены нефтепродуктами, тяжелыми металлами, бензапиреном и т.д. [7]. Представляется актуальным оценить нарушения комплекса почвенных микромицетов в естественных экосистемах вне городской черты в зоне влияния крупных автомагистралей федерального значения. Биоиндикация почвы важна также при оценке размеров отчуждения земель из сельскохозяйственного использования вдоль автотрасс для получения экологически безопасной продукции растениеводства.

Цель работы – изучение нарушения комплекса почвенных микромицетов в зоне влияния автомагистрали федерального значения М4 «Дон» и определение информативных параметров для санитарно-гигиенического мониторинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоиндикацию почвы проводили в течение 3-х лет в динамике по сезону. Почва – чернозем выщелоченный и обыкновенный. Пробы отбирали на расстоянии 10 м от полотна дороги, контроль – на расстоянии 100 м в 5 пунктах (Липецкая – юг Воронежской области).

Численность почвенных грибов определяли на среде Чапека. Видовую структуру микромицетов разных классов устанавливали по соответствующим определителям (Милько А.А., 1974; Кириленко Т.С.,

1977; Билай В.И., 1988; Ellis M.B., 1980; Pitt J., 1979; Raper K.B., 1949, 1951). Токсигенными считали виды согласно определителям (Билай В.И., 1990; Кашкин П.Н., 1979; Саттон и др., 2001) и собственным исследованиям [6].

Всего идентифицировали 75 изолятов грибов, относящихся к 26 родам. Типичные виды грибов выявляли на основании критериев пространственной и временной встречаемости, рассчитывали индексы видового разнообразия комплексов микромицетов [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Численность почвенных грибов у полотна дороги снижалась, в среднем, по сезону и по точкам отбора примерно в 3 раза (табл.1), что связано с нарушением и загрязнением техногенно-измененной почвы.

Таблица 1.

Структура комплекса почвенных микромицетов в зоне влияния автомагистрали М4 «Дон»

Показатели	Расстояние от дороги	
	100 м	10 м
Численность микромицетов, тыс. КОЕ/г (минимум-максимум/средняя по сезону)	12-65 26,5	1-20 9,1
Количество типичных видов	25	16
Из них часто встречающихся	10-13	14-15
Общих с контролем видов	-	8-10
Из них токсигенных (%)	15	80
Не характерных для контроля видов	-	5-6
Из них токсигенных (%)	-	100
Суммарная плотность типичных видов (%)	43-48	77-81
Из них токсигенных (%)	24-27	93-96
Индекс биоразнообразия Шеннона	3,90-3,95	3,10-3,40
Индекс выравненности Пилу	0,89	0,61-0,64
Индекс доминирования Симпсона	0,08-0,09	0,11-0,17
Коэффициент сходства Сёрнсена	1	0,44-0,65

В контроле (100 м от полотна автотрассы) в комплекс типичных видов чернозема входили 18 видов микромицетов: *Acremonium alternatum* Lk. ex Fries; *Cephalosporium acremonium* Corda; *Fusarium solani* (Mart) Appl. et Wg; *Fusarium oxysporum* (Schlecht) Snyd et Hans; *Paecilomyces lilacinum* Thom.; *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. ex Link) Lind; *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries; *Penicillium tardum* Thom.; *Penicillium expansum* Link.; *Penicillium notatum* West; *Penicillium daleae* Westling; *Trichoderma koningii* Oudem; *T. harzianum* Rifai; *Humicola grisea* Traaen; *Aspergillus ustus* (Bain) Thom. et Church.; *Gliocladium virens* Miller, Giddens et Foster; *Alternaria alternata* Ness., *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link. Кроме того, более 40 видов грибов выделялись из контрольной почвы в ранге редко встречающихся или случайных [3].

На расстоянии 10 м от полотна автотрассы видовое богатство комплекса микромицетов снижалось за счет элиминации редких и случайных видов, плотность которых была ниже контроля примерно в 3 раза. Это явление известно как «концентрация доминирования». В результате снижаются показатели видового разнообразия и выравненности комплекса, и возрастает индекс доминирования.

Комплекс почвенных грибов не только обеднялся, но изменялся и его видовой состав. Вблизи автотрассы некоторые из часто встречающихся видов почвенных грибов переходили в ранг случайных или вообще не выделялись. Другие виды микромицетов, напротив, повышали свой ранг доминирования. Кроме того, из почвы вблизи автомагистрали были выделены такие виды, как: *Aspergillus clavatus* Desmaz.; *Aspergillus ochraceus* Wilhelm; *Aspergillus terreus* Thom.; *Aspergillus terricola* March.; *Aspergillus fumigatus* Sacc. et March.; *Citromyces* sp., *Penicillium funiculosum* Thom.; *Penicillium rubrum* Stoll.; *Penicillium viridicatum* Westling; *Talaromyces flavus* (Klockner) Stolk et Samson; *Botryotrichum piluliferum* Sacc. et March.; *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb. ex Link) Hugnes, которые в контроле не наблюдали.

Следовательно, нарушения комплекса почвенных микромицетов в техногенно-измененной почве вблизи полотна автомагистрали федерального значения М4 «Дон» связаны не только с его обеднением и перегруппировкой видов по частотам встречаемости, но и с изменением его видового состава. Коэффициент сходства Сёрнсена естественного и нарушенного чернозема не превышал 0,44-0,65.

К чувствительным к автотранспортной нагрузке видам, которые резко снижают свою частоту встречаемости или исчезают, относятся стенотопные для чернозема лесостепной зоны почвенные грибы или эпифиты растений (табл. 2).

Таблица 2

Реакция почвенных микромицетов на автотранспортную нагрузку

Виды микромицетов	Группы видов
<i>Acremonium alternatum</i> , <i>Cephalosporium acremonium</i> , <i>Fusarium spp*</i> , <i>Paecilomyces lilacinum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Чувствительные
<i>Penicillium tardum</i> , <i>P. expansum*</i> , <i>P. notatum*</i> , <i>P. daleae</i> , <i>Trichoderma koningii*</i> , <i>T. harzianum*</i> , <i>Humicola grisea*</i> , <i>Aspergillus ustus*</i> , <i>Gliocladium virens*</i> , <i>Alternaria alternata*</i> , <i>Cladosporium herbarum*</i>	Устойчивые
<i>A. clavatus*</i> , <i>A. ochraceus*</i> , <i>A. terreus*</i> , <i>A. terricola*</i> , <i>A. fumigatus*</i> , <i>Citromyces</i> sp., <i>P. funiculosum*</i> , <i>P. rubrum*</i> , <i>P. viridicatum*</i> , <i>Talaromyces flavus*</i> , <i>Botryotrichum piluliferum*</i> , <i>Stachybotrys chartarum*</i>	Индикаторные

* токсигенные виды; жирным шрифтом выделены патогенные и аллергенные виды.

Для целей биоиндикации можно использовать устойчивые виды, частота встречаемости которых остается неизменной, а более надежно – индикаторные виды, доля которых резко возрастает или же они выделяются только у полотна автотрассы.

Обращает на себя внимание тот факт, что большинство устойчивых и все индикаторные на автотранспортную нагрузку виды микроскопических грибов относят к токсигенным. Их доля в почве у полотна дороги возросла в 3,5 раза и достигала 93-97%. Большинство видов, доминирующих в почве на расстоянии 10 м от автотрассы, как показано нами ранее, проявляют широкий спектр биологического действия (антибиотики, фунгициды, фитотокси-

ны) [8]. Среди чувствительных к автотранспортной нагрузке видов практически нет токсигенных. По-видимому, синтез токсичных вторичных метаболитов помогает индикаторным видам микромицетов выигрывать обостряющуюся конкурентную борьбу в техногенно-измененных почвах в условиях лимитирования и ингибирования роста [3].

Кроме того, среди почвенных грибов из групп устойчивых и индикаторных на автотранспортную нагрузку многие известны как условно-патогенные виды или обладают аллергенными свойствами, что представляет опасность для здоровья городского населения с ослабленным иммунным статусом [5; Марфенина О.Е. // Проблемы мед. микологии. – 2002. – Т. 4, №2; Елинов Н.П. // Проблемы мед.микологии. – 2002. – Т. 4, №3]. Для *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. ustus*, *Alternaria alternata* доказана роль в развитии аспергиллезов легких, плевритов, бронхопневмонии, отомикозов, микотических анги, абсцессов [7]. Аллергические реакции – дерматиты, бронхиальную астму, риниты, конъюнктивиты, сенсibilизацию организма вызывают *C. herbarum* и многие виды рода *Penicillium* (*P. expansum*, *P. notatum*, *P. funiculosum*, *P. viridicatum*), рода *Trichoderma* (*T. koningii*, *T. harzianum*) и рода *Gliocladium* [5; Марфенина О.Е. // Проблемы мед. микологии. – 2002. – Т. 4, №2].

Важную проблему представляет оценка размеров отчуждения земель из сельскохозяйственного использования вдоль автотрасс. Накопление токсигенных видов грибов в почве вдоль оживленных автомагистралей может привести к накоплению опасных для здоровья человека микотоксинов в сельскохозяйственной продукции [Елинов Н.П. // Проблемы

мед. микологии. – 2002. – Т. 4, №3]. По нашим данным, зону нарушения комплекса почвенных микромицетов чернозема под действием автотранспортной нагрузки автомагистрали федерального значения М4 «Дон» оценивают в 50 м на ровном рельефе местности и в 100 м – на рельефе понижения [9]. Эта зона должна быть исключена из сельскохозяйственного использования для получения экологически чистой растениеводческой продукции.

Таким образом, нами обнаружены значительные нарушения состава и структуры комплекса микромицетов чернозема в условиях интенсивной автотранспортной нагрузки в зоне влияния автомагистрали «Дон». Экологическая направленность сукцессии почвенных грибов состоит в отборе видов, синтезирующих микотоксины с широким спектром биологического действия, что позволяет им выигрывать обостряющуюся в условиях загрязнения конкурентную борьбу. Выявленные нарушения представляют непосредственную опасность для здоровья человека, накапливаемые виды грибов могут вызывать микотоксикозы, а у людей с пониженным иммунным статусом – микозы и аллергические реакции. Следовательно, не только в городах, но и в естественных экосистемах вне городской черты – в придорожной полосе крупных автомагистралей в техногенно нарушенной почве имеют место однотипные нарушения микробного сообщества.

Биоиндикация информативна для санитарно-гигиенического мониторинга почвы. Микробиологические показатели (списки индикаторных видов грибов) необходимо использовать для мониторинга почв, подверженных автотранспортной нагрузке.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. – М.: Академия, 2005. – 445 с.
2. Хабибуллина Ф.М. Почвенная микобиота естественных и антропогенно нарушенных экосистем северо-востока европейской части России: Автореф. дисс... док. биол. наук. – Сыктывкар, 2009. – 40 с.
3. Свистова И.Д. Биодинамика микробного сообщества чернозема в антропогенных экосистемах лесостепи. Автореф. дисс... док. биол. наук. – Петрозаводск, 2005. – 50 с.
4. Биологический мониторинг природно-техногенных систем. / Под ред. Т.Я. Ашихминой, Н.М. Алалыкиной. – Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2011. – 388 с.
5. Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А. Микроскопические грибы в связи с проблемами биологической безопасности (обзор) // Проблемы мед. микологии. – 2011. – Т. 13, №3. – С. 3-12.
6. Свистова И.Д., Щербаков А.П., Корецкая И.И., Талалайко Н.Н. Накопление токсичных видов микроскопических грибов в городских почвах // Гигиена и санитария. – 2003. – № 5. – С. 54-57.
7. Назаренко Н.Н., Свистова И.Д. Микробиологическая индикация почв урбандошадтов. – Воронеж: ВГАУ, 2013. – 135 с.
8. Свистова И.Д., Сенчакова Т.Ю. Спектр биологической активности микромицетов чернозема // Проблемы мед. микологии. – 2009. – Т. 11, №1. – С. 30-34.
9. Свистова И.Д., Корецкая И. И., Щербаков А. П. Влияние рельефа и типа придорожных экосистем на биодинамику микробного сообщества почвы в зоне влияния автомагистрали «Дон» // Вестник Воронежского ГУ. Сер. география и геозкология. – 2005. – № 2. – С. 107-114.

Поступила в редакцию журнала 16.11.14

Рецензент: В.Г. Корнишева



ИЗУЧЕНИЕ РОСТА *STACHYBOTRYS* SPP. НА РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦАХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

**Доршакова Е.В.* (н.с.), Елинов Н.П. (проф.
кафедры), Мамошин А.Н. (лаборант-
исследователь)**

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина и кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2014

Контаминация зданий микромицетами происходит, несмотря на развитие технологий строительства и производства используемых в нем материалов [1]. Умеренный климат и повышенная влажность в Санкт-Петербурге благоприятствуют росту биомассы микромицетов в почве и на растительных субстратах. В целях уменьшения распространения микромицетов-биодеструкторов в стенах зданий важно изучить особенности их роста на природных субстратах, выявить наиболее предпочтительные из них.

Ключевые слова: микромицеты-биодеструкторы, природные субстраты, целлюлазы

STUDY OF *STACHYBOTRYS* SPP. GROWTH ON DIFFERENT SAMPLES OF PLANT MATERIALS

**Dorshakova E.V. (scientific collaborator),
Elinov N.P. (professor of the chair),
Mamoshin A.N. (laboratory assistant)**

North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2014

Buildings contamination by fungi happens despite of construction technologies development and its materials production. Temperate climate and high humidity in St. Petersburg are beneficial for fungies growth in soil and plant materials. It is important to study fungies growth particularities in natural substrates to decline its spreading in buildings.

Key words: cellulase, fungi-biodestructors, natural materials

Особенности *Stachybotrys* spp. как дереворазрушающих грибов.

Stachybotrys spp. – одни из наиболее опасных микромицетов-биодеструкторов, широко распространенных в природе и антропогенной среде. В естественной среде обитания они чаще встречаются на гниющих растительных остатках, в помещениях – на деревянных конструкциях [1-4]. Рост *Stachybotrys* spp. на материалах, содержащих целлюлозу, обусловлен их высокой целлюлозолитической активностью.

Древесина – старейший по времени использования строительный материал. Наиболее часто его применяют при внутренних отделочных работах жилых и производственных помещений, опорных кольев и свай, заглубленных (забитых или в форме лежней-плотов) в грунт. Известно, что деревянные колья, сваи являются основаниями Московского кремля, кремлевских стен Новгорода и Пскова, Исаакиевского Собора в Санкт-Петербурге, а также культовых и общественных зданий древних городов Германии и Франции вдоль реки Рейн, причальных стен Лондона. Разрушение деревянных опорных конструкций сопровождается разрушением самого сооружения [Улицкий В.М. Биопоражения деревянных строительных конструкций и способы их усиления. – СПб., 1999]. По мнению ученых, во избежание разрушения микромицетами на протяжении сотен (тысяч) лет, древесина должна находиться ниже верхнего уровня грунтовых вод, в холодной среде, при низком содержании кислорода (анаэробноз) и отсутствии питательных веществ для микроорганизмов [5].

Дереворазрушающие грибы вызывают разложение (декомпозицию) древесины, называемое гнилью. Эту деятельность грибов определяют особенности их физиологии: способность гиф прорасти внутрь древесины и, благодаря наличию целлюлозолитических ферментов, расщеплять основной её материал – целлюлозу. По данным В. Рипачек [8], *Stachybotrys* spp. вызывают умеренную (мягкую) гниль, наряду с другими представителями сумчатых и несовершенных грибов: *Chaetomium globosum*, *C. elatum*, *C. funicolum*, *Trichoderma lignorum*. Умеренная (плесневая, мягкая) гниль – деструктивный распад древесины, при котором разлагается только полисахаридная часть древесины. Характерной особенностью микромицетов, вызывающих «мягкую гниль», является способность развиваться в условиях постоянно высокой влажности древесины, при которой не могут расти другие дереворазрушающие грибы. Плесневой гнилью заражена древесина в градирнях и конструкциях, находящихся постоянно в воде (части плотин, деревянных судов), во влажной почве (телеграфные столбы, шпалы, парники).

Кора растений менее подвержена разрушению микромицетами благодаря наличию суберинизированных клеточных оболочек, препятствующих проникновению грибов и их ферментов внутрь клеток. Химическое строение и анатомический состав древесной коры и древесины имеют много обще-

* Контактное лицо: Доршакова Евгения Владимировна, тел.: (812) 303-51-40

го. Соотношение компонентов целлюлоза : лигнин : гемицеллюлоза в коре и древесине отличается. По сравнению с другими составляющими, кора характеризуется наибольшим содержанием лигнина – 1:2:1. В древесине это соотношение составляет 2:1:1. Нередко целлюлозоразрушающие и лигнин-разрушающие грибы изменяют окраску древесины, съедая целлюлозу и лигнин, придавая ей более светлую или красноватую окраску. Посветление древесины связано с действием окислительных ферментов, выделяемых микромицетами при разложении лигнина; потемнение древесины – с присутствием веществ гумусового характера, образуемых бурой гнилью при разрушении целлюлозы [Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов. – М., 1967]. У некоторых грибов ученые отмечают изменение окраски гиф при разложении древесины (Ванин С.А. Андреев И.Е., 1936).

Целлюлоза как питательный субстрат микромицетов и ферменты микромицетов, катализирующие реакцию гидролиза целлюлозы.

Целлюлаза – сложный ферментный комплекс, необходимый для разложения целлюлозы микроорганизмами [6], она же структурный компонент растительных клеток, линейный полимер из глюкозных остатков, соединенных 1,4-β-связями.

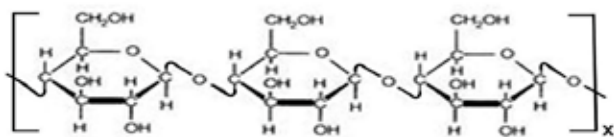


Рис.1. Структурная формула фрагмента целлюлозы

Индивидуальные цепочки полимера могут соединяться друг с другом водородными связями, образуя кристаллическую структуру. Участки целлюлозы, имеющие кристаллическое строение, чередуются с аморфными. Ферментная система грибов для разложения целлюлозы включает 1,4-β-эндоглюканазы, неупорядочно разрывающие 1,4-β-связи внутри макромолекулы, 1,4-β-экзоглюканазы, отщепляющие с нередуцирующих концов дисахарид целлобиозу, и 1,4-β-глюкозидазы, гидролизующие целлобиозу с образованием глюкозы. Известно, что клетки грибов выделяют в субстрат экзоэнзимы, которые работают преимущественно внутри клеток микромицетов, обеспечивая их внутренние метаболические процессы. В субстрат эндоэнзимы поступают, как правило, после отмирания живых клеток гриба [5].

Активность ферментов целлюлазного комплекса обеспечивает рост микромицетов на питательных средах, единственным источником углерода в которых является целлюлоза. Робертом Томасом была выявлена прямая зависимость роста массы мицелия и возрастания продукции внеклеточной целлюлазы. При изучении роста микромицетов на среде, единственным источником углерода в которой была глюкоза, выявили наличие фермента р-нитрофенил β-глюкозидазы и отсутствие целлюлазы.

Важное значение имеет изучение роста микро-

мицетов на природных субстратах в условиях, приближенных к естественным. Методом визуальной оценки роста микромицетов на растительном субстрате можно комплексно оценить работу ферментов целлюлазной и лигнин-литической активностей в условиях, приближенных к естественным, выявить наиболее предпочтительный вид растительного субстрата для *Stachybotrys* spp. Особенности роста отдельных штаммов *Stachybotrys* spp. мы оценивали на четырех различных видах древесных растений.

Методы исследования:

- культуральный: посев микромицетов в пробирки, содержащие 0,9% раствор натрия хлорида и образцы (простерилизованные в течение 30 мин. при 1 атмосфере) растительных субстратов с корой, а также без коры;

- световая микроскопия.

Материалы исследования:

- культуры 15 штаммов *Stachybotrys* spp., выращенные на питательной среде Сусло-агар;

- фрагменты побегов следующих древесных растений: березы (*Betula*), липы (*Tilia*), шиповника (*Rosa*), ели (*Picea*).

Смывы спор с культур 14 штаммов *S. chartarum* и 1 штамма *S. chlorochalonata* были взяты в количестве $2,6 \cdot 10^6 \pm 0,2 \cdot 10^6$ на мл (подсчет конидий в суспензии проводили в камере Горяева). Суспензии спор каждого штамма *Stachybotrys* spp. вносили в пробирки с 5 мл раствора натрия хлорида по 100 мкл. В каждую пробирку помещали фрагмент побега длиной 5-10 см одного из растений. Рост микромицетов оценивали визуально на 7, 14, 23 сутки экспозиции. Для описания характера роста микромицетов в физиологическом растворе с образцами фрагментов растений, а также роста на границе физиологического раствора с воздухом, использовали следующие критерии: 0 – отсутствие признаков роста микромицетов; 1 – появление тонкой пленки мицелия на поверхности физиологического раствора или помутнение раствора; 2 – пленка мицелия хорошо развита (её толщина от 0,5 мм) или появление хлопьев в растворе; 3 – слабое спороношение; 4 – обильное спороношение; ▲ – рост мицелия наблюдали на растительном материале (Рис.1); * – слабое окрашивание раствора в оранжевый цвет, ** – умеренное окрашивание раствора в оранжевый цвет, *** – интенсивное окрашивание раствора в оранжевый цвет; сокращения: *S. ch.* – *S. chartarum*, *S. chl.* – *S. chlorochalonata* (табл).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

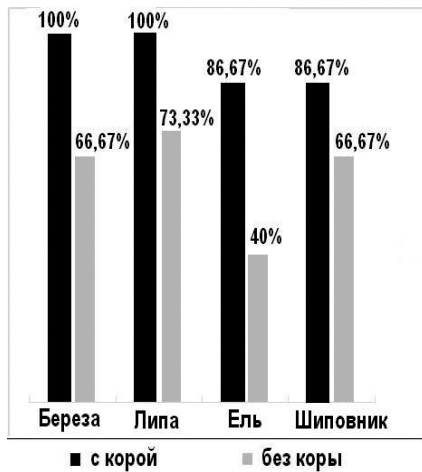


Рис.1. Рост мицелия на растительном материале (▲)

Таблица

Рост микромицетов на образцах растительных субстратов

№ штамма	Время экспозиции, сут.	Вид растения							
		Береза		Липа		Ель		Шиповник	
		Наличие коры на растительном образце, +/-							
		+	-	+	-	+	-	+	-
1 S.ch.	7	1	0	0	1	3	2	0	1
	14	1▲	1	0	1	3	2	0	1
	23	1▲	1▲	0▲	3▲***	3▲*	2▲	1▲	1
2 S.ch.	7	1	0	1	1	2	2	1	0
	14	1▲	1	1	1	2	2	1	0
	23	1▲	1▲	1▲	1	2▲	2	1▲*	1▲
3 S.ch.	7	1	0	1	0	3	1	1	0
	14	1▲	0	1	0	3	1	1	0
	23	1▲	0	1▲	1	3▲**	1▲	2▲**	1▲
4 S.ch.	7	1	0	1	0	3	3	0	1
	14	1▲	0	2	3	4	4	1	1
	23	1▲	1▲	3▲	3▲**	4▲**	4▲**	3▲*	3▲*
5 S.ch.	7	1	1	3	1	3	2	1	0
	14	1▲	1▲	3	1	3	2	2	0
	23	1▲	1▲	3▲	1▲*	4▲***	2	3▲*	1*
6 S.ch.	7	1	0	1	0	4	2	3	1
	14	1▲	0	1	0	4	2	3	1
	23	1▲	0	1М	1▲	4▲**	3	3▲**	1▲*
7 S.ch.	7	1	0	1	0	4	3	1	2
	14	1	1▲	1	0	4	3	1	2
	23	1▲	2▲	3▲	1▲	4▲***	3▲	1▲*	4▲***
8 S.ch.	7	1	0	1	2	3	3	1	2
	14	1	0	1	3	3	3	1	2
	23	1▲	0	1М	3▲**	3▲***	3▲	1▲	2▲**
9 S.ch.	7	1	0	1	1	3	2	0	0
	14	1▲	0	1	1	3	2	2	0
	23	1▲	1▲	3▲	1▲	3▲***	4▲**	3**	1▲*
10 S.chl.	7	0	0	1	0	1	2	0	0
	14	1	0	1	0	1	2	1	0
	23	1▲	0	1▲	0	2*	2	1▲	1
11 S.ch.	7	1	0	3	3	3	2	1	2
	14	1	1	3	3	3	2	1	2
	23	3▲	1▲	3▲	4▲**	3▲**	4	2▲*	2*
12 S.ch.	7	1	0	1	1	3	2	2	2
	14	1	0	1	1	3	2	2	2
	23	1▲	0	3▲	1▲	3▲**	2	2▲*	2▲
13 S.ch.	7	1	0	0	3	3	2	1	0
	14	1▲	2▲	1	3	3	3	1	0
	23	1▲	3▲	3▲	4**	3▲	3	3▲	1▲
14 S.ch.	7	1	0	3	1	3	1	1	2
	14	1▲	0	3	2	3	3	1	2
	23	1▲	1▲	3▲	4▲**	3▲**	3	1▲	2*
15 S.ch.	7	1	0	2	1	3	2	1	2
	14	1▲	1	2	1	3	3	1	2
	23	3▲	1▲	3▲	3▲	4▲***	4	1	2▲▲***

Все штаммы *Stachybotrys* spp. росли в пробирках с образцами ели и шиповника. Четыре штамма *S. chartarum* (№№ 3, 6, 8, 12) и штамм *S. chlorochalonata* №10 не выросли при экспозиции с образцами побегов березы, лишенных коры. Штамм *S. chlorochalonata* также не рос в пробирке с липой без коры. У штамма №1 не обнаружили роста в пробирке с липой (с корой).

Наиболее интенсивный рост микромицетов отмечали в пробирках с образцами неочищенной от коры ели (Рис.2). У 13 штаммов *S. chartarum* присутствовало спороношение уже на 7 день культивирования, из них у пяти (№№ 4, 5, 6, 7, 15) – обильное (4 балла). У *S. chartarum* №2 и *S. chlorochalonata* пленка мицелия на поверхности жидкой фазы была хорошо развита (2 балла). У всех штаммов, за исключением №№ 2 и 13, наблюдали окрашивание физиологического раствора в оранжевый цвет, наиболее интенсивную пигментацию выявили у штаммов №№ 15, 9, 8, 7, 5 (***). В пробирках с образцами очищенной ели спороношение установили у девяти штаммов (№№ 4, 8, 9, 1, 1, 5), из них у четырех (№№ 4, 9, 11, 15) – обильное. Появление спороношения обнаружили на 7 день у трех штаммов – №№ 4, 7, 8, на 14 и 23 день – у трех (№№ 13, 14, 15) и (№№ 6, 9, 11). Хорошо развитая пленка мицелия (2 балла) была у четырех штаммов *S. chartarum* (№№ 1, 2, 5, 12) и *S. chlorochalonata*. У *S. chartarum* №3 рост мицелия был в виде тонкой пленки мицелия на поверхности физиологического раствора (1 балл). Окрашивание раствора наблюдали у штаммов, отличившихся наиболее интенсивным ростом и спороношением (№№ 4, 9) (**).

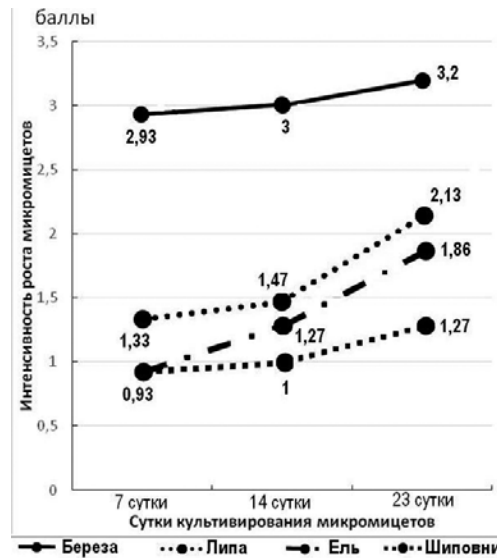


Рис. 2. Интенсивность роста микромицетов в пробирках с образцами растительных с корой

Рост *Stachybotrys* spp. на шиповнике отличается разнообразием стадий на конечных сутках культивирования (таб.). Рост микромицетов в пробирках с образцами побегов шиповника был преимущественно в виде хлопьев в растворе с оранжевой окраской. У пяти штаммов *S. chartarum* (№№ 4, 5, 6, 9, 13) в про-

бирках с неочищенными побегами выявили спороношение, у шести (№№ 1, 2, 7, 8, 14, 15) и у *S. chlorochalونات* отмечали лишь помутнение раствора. У трех штаммов (№№ 3, 11, 12) рост мицелия проявлялся в форме хлопьев в растворе. На побегах шиповника, лишенных коры, у семи *S. chartarum* (№№ 1, 2, 3, 5, 6, 9, 13) и у *S. chlorochalونات* рост микромицетов ограничивался помутнением раствора. У пяти штаммов (№№ 8, 11, 12, 14, 15) на поверхности жидкой фазы обнаружили появление хлопьев в растворе. Спорношение имело место у двух штаммов *Stachybotrys* spp.: №4 – начало спорношения и №7 – обильное спорношение (Рис.3).

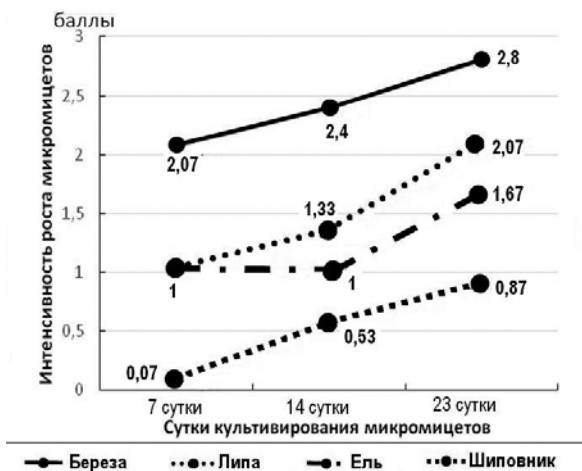


Рис. 3. Интенсивность роста микромицетов в пробирках с образцами растительных материалов без коры

Наименее интенсивным рост микромицетов был на березе (таб., Рис.2). У 13 штаммов *Stachybotrys* spp. рост в пробирках с образцами неочищенных побегов был выявлен в виде тонкой пленки мицелия на поверхности физиологического раствора на всех сутках культивирования, у двух (№11,15) наблюдали спорношение на 23 сутки культивирования.

Рост большинства микромицетов в пробирках с физиологическим раствором и побегами березы, лишенными коры, также представлял собой тонкую пленку мицелия, однако появлялась она позднее – на 14 сутки экспозиции. Лишь у одного штамма (№5) установили рост на 7 сутки. У четырех штаммов *S. chartarum* (№№ 3, 6, 8, 12) и *S. chlorochalونات* роста в пробирках с образцами растений не было. Обращают на себя внимание два штамма: №7, рост которого был выявлен в виде хорошо развитой пленки мицелия (23 сутки); № 13, характеризующийся хорошо развитой пленкой мицелия и появлением единичного спорношения (14, 23 сутки).

Рост микромицетов в пробирках, содержащих физ.раствор с побегами липы, отмечали у 14 штаммов на поверхности физ.раствора и побегах растения и у одного штамма – лишь на поверхности растения. У девяти штаммов *Stachybotrys* spp. обнаружили спорношение: у штаммов № 4, 7, 9, 13 – на 23 сутки, у штаммов №5, 11, 12, 14, 15 – на 7-е; №№ 7, 9 – на 23-и. Роста штамма №1 на поверхности раствора не было,

на 23 сутки наблюдали его рост на растительном субстрате. Рост штаммов №№ 2, 3, 6, 10 проявлялся в виде тонкой пленки на поверхности жидкой фазы (7-14 сутки), а к 23 суткам – в виде слабого налета на субстрате.

Рост *Stachybotrys* spp. в пробирках с физ. раствором и очищенными от коры побегами липы отмечали у 14 штаммов *S. chartarum*, штамм *S. chlorochalونات* не вырос ни на поверхности среды, ни на растительном субстрате. У семи штаммов *S. chartarum* выявили спорношение, из них на 7 сутки культивирования – у штаммов №№ 11, 13, на 14-е – у №№ 4, 8, на 23 – у №№ 1, 14, 15. Обильное спорношение установили у штаммов №№ 11, 13, 14. Во всех случаях стадия спорношения микромицетов на 23 день сопровождалась окрашиванием раствора в насыщенный оранжевый цвет, у штамма №1 окрашивание раствора было наиболее интенсивным. Рост штаммов №№ 3, 6, 7 был более медленным, по сравнению с таковым других штаммов, и проявлялся лишь к 23 суткам роста. Рост микромицетов в пробирках с физиологическим раствором и образцами липы без коры отличался наибольшим разнообразием тенденций к росту, проявляющимися в виде замедления роста у одних штаммов и, напротив, ускоренного и более интенсивного роста у других (таб.). Также отличительной особенностью роста микромицетов в пробирках с образцами очищенной липой является образование пигмента при интенсивном спорообразовании. При использовании очищенной липы в качестве субстрата спорношение обнаружили у девяти штаммов, среди которых обильное – у пяти. Замедленное развитие наблюдали у штамма №3 – тонкую пленку мицелия. Таким образом, неочищенная липа является наиболее благоприятным субстратом для роста микромицетов, чем липа, лишенная коры.

ВЫВОДЫ

1. Ель является наиболее подходящим для роста *Stachybotrys* spp. субстратом, береза – наименее.
2. Наиболее интенсивный рост микромицетов наблюдали на побегах, имеющих кору, по сравнению с таковыми, лишенными коры.
3. Лигнин – наиболее подходящий для роста *Stachybotrys* spp. субстрат, содержащий углерод. Интенсивному росту микромицетов на коре способствовало, вероятно, разрушение суберинизированных слоев клеточных оболочек пробковой ткани коры при автоклавировании.
4. В пробирках с побегами березы, ели, липы рост *Stachybotrys* spp. обнаружили на границе физиологического раствора с воздухом, в пробирках с побегами шиповника – в планктонной форме в виде хлопьев.
5. Выявили появление пигмента при ярко выраженном росте микромицетов в пробирках с образцами побегов липы, лишенных коры, ели и шиповника как с корой, так и без.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Доршакова Е.В., Елинов Н.П., Павлова И.Э. и др. Микромицеты в естественной среде обитания и в помещениях – их потенциальная опасность для здоровья людей // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, №3. – С. 53-57.
2. Pestka J.J., Yike I., Dearborn D.G., et al. *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins and damp building – related illness: new insights into a public health enigma // Toxicological sciences. – 2008. – Vol. 104. – P. 4-26.
3. Cameron D.G. Toxicity profile of *Stachybotrys chartarum* // A thesis in environmental toxicology/ submitted to the graduate faculty of Texas tech university in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science. – 2009.
4. Доршакова Е.В. Морфолого-физиологические особенности токсинообразующих грибов - биодеструкторов из рода *Stachybotrys* // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, №3. – С. 13-21.
5. Васильева Н.В., Елинов Н.П. Микроорганизмы - контаминанты и патогены - индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей (учебное пособие) /Под ред. Н. П. Елинова. – СПб.: КОСТА, 2009. – 224 с.
6. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. вузов / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.

Поступила в редакцию журнала 16.12.2014

Рецензент: А.А. Степанова



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИМИКОТИКАМ *CANDIDA* SPP. В СОСТАВЕ БИОПЛЕНОК

**Пинегина О.Н.* (ассистент кафедры),
Рауш Е.Р. (аспирант), Васильева Н.В.
(директор института, зав. кафедрой)**

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина и кафедра медицинской микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2014

Определена чувствительность ранее выделенных с катетеров Candida spp. к наиболее часто применяемым в стационарах антимикотикам: флуконазолу, вориконазолу, амфотерицину В, каспифунгину. Candida spp. проявляли выраженную устойчивость к флуконазолу и вориконазолу. Амфотерицин В и каспифунгин наиболее активны в отношении биопленок различных видов Candida spp.

Ключевые слова: биопленки, *Candida* species, катетер-ассоциированные инфекции, резистентность

TESTING OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY OF *CANDIDA* IN BIOFILMS

Pinegina O.N. (assistant of the chair), Raush E.R. (postgraduate student), Vasilyeva N.V. (director of the institute, head of the chair)

North-western State Medical University named after I.I. Mechnikov: Kashkin Research Institute of Medical Mycology and Chair of Medical Microbiology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2014

We have determined the sensitivity of previously isolated from catheters Candida spp. the most widely used in hospitals antimycotics: fluconazole, voriconazole, amphotericin B, caspofungin. Candida species exhibit a pronounced resistance to fluconazole and voriconazole. Amphotericin B and caspofungin – the most active against various species biofilms Candida spp.

Key words: biofilm, *Candida* species, catheter-associated infections, resistance

Candida spp. занимают третье место в развитии внутрибольничных септицемий у пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [1-3]. Повседневная практика в ОРИТ предполагает многочисленные инвазивные вмешательства, связанные с нарушением целостности кожных и слизистых покровов, что создает условия для проникновения условно-патогенных микроорганизмов во внутреннюю среду организма человека. К наиболее распространенным вмешательствам относят установку внутрисосудистых и уретральных катетеров. Критическим фактором в развитии катетер-ассоциированных инфекций является формирование биопленки на медицинском устройстве – сообществе микроорганизмов одного или нескольких видов, прикрепленных к поверхности и заключенных во внеклеточный полисахаридный матрикс. Микроорганизмы в биопленках относительно изолированы от внешней среды, в том числе – от проникновения антимикробных агентов, и проявляют резистентность к антибиотикам и факторам иммунитета [4, 5].

Часть популяции микроорганизмов может отделяться от биопленки и вызывать острую гематогенную грибковую инфекцию. Было показано, что микроорганизм, отделившийся от биопленки, проявляет большую вирулентность по сравнению с эквивалентными планктонными дрожжами [6]. Инфекции, ассоциированные с биопленками, обычно плохо поддаются антимикробной терапии и, в большинстве случаев, необходима замена инфицированного устройства [4]. Исследованиями показано, что в 80% случаев микроорганизмы в их естественных условиях среды обитания находятся в состоянии биопленки [7], тогда как планктонная стадия служит для колонизации и распространения. Изучение особых характеристик биопленок, в частности, определение их чувствительности к антимикотикам, является актуальной задачей, наряду с оптимизацией выбора антимикробной терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение чувствительности планктонных форм *Candida* spp. к противогрибковым препаратам *in vitro*.

Определение чувствительности к противогрибковым препаратам выполняли по протоколу CLSI M27-A3 (метод микроразведений в жидких питательных средах). Субстанции антимикотиков растворяли и титровали в 96-луночных U-образных планшетах в концентрациях от 128 до 0,03 мкг/мл. Инокулом готовили из суточных культур *Candida* spp., суспендируя их до 0,5 ЕД по Мак Фарланду и разводя до концентрации 0,5-2,5·10³ клеток/мл. В каждую лунку планшета к разведениям антимикотика вносили по 100 мкл инокулюма. Для каждой культуры ставили следующие контроли: питательной среды (среда без культуры и без препарата), культуры (питательная

* Контактное лицо: Пинегина Ольга Николаевна, тел.: (812) 303-51-40

среда с культурой без препарата) и качества исследования с использованием тест-культуры *C. parapsilosis* ATCC 22019. Планшеты инкубировали при 35 °C в течение 24 часов. Определение МИК осуществляли визуально. Оценку чувствительности *Candida* spp. к антимикотикам проводили согласно критериям интерпретации метода M27-A3 S4 (декабрь 2012 г.) [8, 9].

Определение чувствительности *Candida* spp. в составе биопленок сосудистых и уретральных катетеров к антимикотикам *in vitro*.

Определение чувствительности *Candida* spp. в составе биопленок проводили стандартизованным методом [10, 11], основанном на способности метаболически активных клеток грибов восстанавливать соль тетразолия (ХТТ) до растворимых в воде окрашенных продуктов формазана, интенсивность образования которых может быть измерена на ридере для микропланшет.

Штаммы грибов предварительно отсеивали на агаризованную питательную среду, включающую глюкозу, пептон дрожжевой (Yeast Peptone Dextrose, или YPD). Суточную культуру однотипных колоний брали микробиологической петлей и переносили в жидкую среду YPD (20 мл среды в колбе Эрленмейера на 150 мл) и культивировали в течение суток на шейкере (BioSan) при 150 об/мин при 37 °C. Клетки собирали и центрифугировали при 3000g 3 минуты, трижды отмывали холодным стерильным 10 мМ фосфатным буфером с добавлением 2,7 мМ KCl и 137 мМ NaCl, pH=7,4 (Sigma). После этого клетки суспендировали в среде RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) 1640 с глутамином без бикарбоната (Sigma), забуференной морфолинопропансульфоновой кислотой (MOPS) до клеточной плотности $1,0 \cdot 10^6$ кл/мл (подсчет осуществляли в камере Горяева). 100 мкл суспензии переносили в ячейки стерильного 96-луночного плоскодонного планшета (Медполимер, Санкт-Петербург). Для каждой комбинации штамм/антифунгальный агент заготавливали 2 повторности. Лунки в колонке 12 оставляли незасеянными и использовали как отрицательный контроль. Планшеты инкубировали в течение 48 часов при 37 °C до формирования зрелой биопленки. Через 48 часов надосадочную жидкость сливали и трижды промывали стерильным фосфатным буфером для удаления планктонных клеток. Остатки фосфатного буфера удаляли фильтрованием. Антимикотики добавляли методом серийных двукратных разведений в лунки с 1 по 10 в концентрациях: для флуконазола (Sigma) – от 1024 до 2 мкг/мл, для вориконазола (Sigma) – от 128 до 0,125 мкг/мл, для амфотерицина В (Биолот) – от 16 до 0,003125 мкг/мл, для каспофунгина (Sigma) – от 16 до 0,03125 мкг/мл. Рабочие концентрации растворов антимикотиков были приготовлены в среде RPMI 1640 с глутамином без бикарбоната. В лунки «11» антимикотики не добавляли и использовали как положительный контроль. Планшеты культивировали 48 часов при 37 °C.

Через 48 часов планшеты трижды промывали 10мМ фосфатным буфером, остатки которого удаляли фильтрованием. Насыщенный раствор ХТТ (0,5 г/л) готовили в растворе Хартмана с последующим фильтрованием через фильтр с размером пор 0,22 мкм (JetBiofil). Непосредственно перед исследованием к раствору ХТТ добавляли менадион до конечной концентрации 1 мкМ. 100 мкл раствора «ХТТ-менадион» добавляли во все лунки, включая положительный и отрицательный контроли. Планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37 °C в темноте. Колориметрические измерения восстановления ХТТ измеряли на ридере для микропланшет (Labsystems iEMS Reader MF) при длине волны 492 нм. Минимальные ингибиторные концентрации определяли по торможению антимикотиком 50% (МИК50) и 80% (МИК80) биопленки (снижение значения поглощения по сравнению с контролем).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы определили чувствительность к антимикотикам 44 видов *Candida* spp., обнаруженных в составе биопленок на сосудистых и уретральных катетерах. Исследования по определению микробного состава биопленок описаны нами ранее [12].

При определении чувствительности стандартным методом CLSI M27-A3 показано, что все выделенные штаммы *C. albicans* были чувствительны к флуконазолу и вориконазолу (МИК для чувствительных штаммов для флуконазола ≤ 2 мкг/мл, для вориконазола $\leq 0,125$). В отношении биопленок максимальная концентрация флуконазола (1024 мкг/мл) не влияла на жизнеспособность грибов. Биопленки всех видов грибов были резистентны к вориконазолу (таб.). Штаммы *C. krusei*, обладающие природной резистентностью к флуконазолу, сохраняли ее и в биопленках, однако МИК возросла с 64 до 1024 мкг/мл. Аналогичные свойства проявлял штамм *C. norvegensis*. Минимальная ингибирующая концентрация амфотерицина В в отношении биопленок практически всех видов превышала МИК планктонных микроорганизмов в 8-16 раз. По критериям интерпретации не удастся соотнести данные МИК для амфотерицина В в соответствии с категориями «чувствительный/резистентный», однако эти значения превышают терапевтические концентрации. Каспофунгин обладал наибольшей активностью в отношении биопленок всех изученных видов. Мы не обнаружили ни одного штамма, резистентного к каспофунгину, как при определении чувствительности планктонных микроорганизмов, так и в составе биопленок. МИК для каспофунгина планктонных дрожжей либо совпадали с эквивалентными МИК биопленок, либо превышали в 2-4 раза, но не выходили за пределы МИК чувствительных штаммов.

ВЫВОДЫ

1. *Candida* spp. в биопленках проявляли выраженную резистентность к флуконазолу и ворикона-

**Определение чувствительности к антимикотикам различных *Candida* spp.,
выращенных в состоянии планктонных клеток и биопленок**

Вид гриба	МИК (мкг/мл)											
	Флуконазол			Вориконазол			Амфотерицин В			Каспофунгин		
	П-МИК	Б-МИК 50	Б-МИК 80	П-МИК	Б-МИК 50	Б-МИК 80	П-МИК	Б-МИК 50	Б-МИК 80	П-МИК	Б-МИК 50	Б-МИК 80
<i>C. albicans</i> (n=23)	0,25-2	>1024	>1024	0,03-0,125	64-128	128	0,25-0,5	0,25-4	1-8	0,015-0,03	0,03-0,06	0,25
<i>C. parapsilosis</i> (n=5)	0,5-64	>1024	>1024	0,03-4	64	128	0,25-0,5	0,5-4	1-8	0,015-0,03	0,25	0,25
<i>C. tropicalis</i> (n=4)	4-32	>1024	>1024	0,03-4	64	128	0,5-1	1-4	1-8	0,015-0,03	0,06	0,125-0,25
<i>C. glabrata</i> (n=1)	16-32	>1024	>1024	0,06-0,125	34-64	64	0,125-0,5	0,5-2	1-8	0,015-0,03	0,03-0,06	0,125-0,25
<i>C. krusei</i> (n=1)	64	>1024	>1024	0,25	128	128	0,5	2	16	0,125	0,06	0,125
<i>C. kefyr</i> (n=2)	0,25-0,5	>1024	>1024	0,03-0,06	16	32	0,25	0,5-1	1	0,015	0,03	0,03
<i>C. guilliermondii</i> (n=1)	4	>1024	>1024	0,06	16	16	0,25	0,5	1	0,015	0,03	0,03
<i>C. norvegensis</i> (n=1)	64	>1024	>1024	8	128	256	0,5	1	8	0,03	0,06	0,03

П-МИК - Минимальная ингибирующая концентрация у планктонных форм, Б-МИК50, Б-МИК80 - концентрация антимикотика, приводящая к снижению оптической плотности на 50% и 80% соответственно (у биопленок)

золу (МИК, подавляющая рост биопленок, в 1000 раз превышала МИК, подавляющую рост планктонных микроорганизмов).

2. Наибольшую активность в отношении биопленок *Candida* spp. проявляли амфотерицин В и каспо-

фунгин.

3. В клинической практике при хронических инфекциях следует помнить о том, что микроорганизмы в биопленках могут проявлять и проявляют иные фенотипические свойства.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Pannanusorn S., Fernandez V. & Romling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection // *Mycoses*. – 2012. – Vol. 56. – P. 264-272.
2. Valles J., Ferrer R. Bloodstream infections in the ICU // *Infect. Dis. Clin. N. Am.* – 2009. – Vol. 23. – P. 557-569.
3. Ramage G., Martinez J.P., Lopez-Ribot J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – Vol. 6. – P. 979-983.
4. Ramage G., Rajendran R., Sherry L., Williams C. Fungal biofilm resistance // *Int. J. of Microbiol.* – 2012. Vol. 2012. Article ID 528521. – 14 p.
5. Tobudic S., Kratzer C., Lassnigg A., Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms // *Mycoses*. – 2011. – Vol. 55. – P. 199-204.
6. Uppuluri P., Chaturvedi A.K., Srinivasan A., et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle // *PLoS Pathog.* – 2010. – Vol. 6, №3. Article ID e1000828. – 13 p.
7. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces // *Emerg. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 8, №9. – P. 881-890.
8. CLSI (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3.
9. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts - Fourth Informational Supplement, M27-S4. CLSI, Wayne, PA. – USA, 2012.*
10. Ramage G., Walle K.V., Wickes B.L., Lopez-ribot J.L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms // *Antimicrob. Agents and Chemoth.* – 2001. – Vol. 45, №9. – P. 2475-2479.
11. Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing // *Nat. Protoc.* – 2008. – Vol. 3, №9. – P. 1494-1500.
12. Пинегина О.Н., Васильева Н.В., Сатурнов А.В. Видовой состав микроорганизмов, образование биопленок и колонизация центральных венозных и уретральных катетеров // *Проблемы медицинской микологии.* – 2013. – Т. 15, №4. – С. 81-85.

Поступила в редакцию журнала 17.12.2014

Рецензент: Т.С. Богомолова



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В ЖУРНАЛ «ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»

Журнал «Проблемы медицинской микологии» нацелен на публикацию оригинальных, ранее не опубликованных в других изданиях в России или за рубежом, статей, научных обзоров, дискуссий, рецензий на книги, методических разработок, хроники и информации. Предварительные сообщения не принимаются. Статьи необходимо сопровождать направлением от учреждения (-й), в котором (-ых) выполнена работа.

Статьи представляются на русском языке с обязательным расширенным резюме на английском языке объемом не более 20 строк. Можно представлять статьи на английском языке с рефератом на русском языке в объеме до 20 строк.

Статьи представляются в редакцию по почте с приложением диска (с распечаткой текста на бумаге в 2-х экземплярах) или по электронной почте (mycobiota@szgmu.ru), подготовленными в текстовом редакторе Win Word. Статьи должны быть напечатаны шрифтом № 12 через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

Размер рукописей не должен превышать 12 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы, фотографии и подписи к ним, список цитированной литературы, представляемые на отдельных листах. Количество иллюстраций не должно превышать двух страниц при их плотном размещении друг к другу.

Рукопись статьи подписывается автором (соавторами), на отдельной странице написать ф.и.о. (полностью) одного из авторов, его должность, адрес электронной почты (для связи) и номер телефона.

Авторское право.

Согласно статье 1228 (глава 69) Гражданского Кодекса РФ часть 4, раздел VII (Права на результаты интеллектуальной деятельности и средства индивидуализации), автором результата интеллектуальной деятельности признается гражданин, творческим трудом которого создан такой результат.

Не признаются авторами результата интеллектуальной деятельности граждане, не внесшие личного творческого вклада в создание такого результата, в том числе оказавшие его автору только техническое, консультационное, организационное или материальное содействие или помощь либо только способствовавшие оформлению прав на такой результат или его использованию, а также граждане, осуществлявшие контроль за выполнением соответствующих работ.

Правила оформления статей:

Сначала пишется **название статьи** заглавными буквами (шрифт 12 – жирный). Затем через 2 интер-

вала указываются **фамилии авторов, инициалы и должности** (шрифт 12 – жирный). Далее через 2 интервала пишется **название учреждения**, в котором выполнена работа. Затем через 2 интервала печатать **резюме на русском языке** (без написания слова «резюме»). Через 2 интервала указать до 7 **ключевых слов**. Затем через 2 интервала (шрифт – 12) пишется **заголовок на английском языке, фамилии, инициалы и должности автора (-ов), резюме** (без написания слов «abstract, summary») **и ключевые слова** (не более 7).

Затем через 3 интервала и с красной строки печатать **текст статьи** в следующем порядке: краткое **введение, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, цитированная литература.**

Латинские названия грибов необходимо писать курсивом; если в заголовке названы род и вид гриба, то после него следует указывать автора, впервые писавшего вид (например, *Aspergillus fumigatus* Fres.); в тексте такая форма уже не повторяется и при повторном упоминании гриба название рода сокращают до первой буквы (например, при первом написании в тексте *Aspergillus fumigatus*, при повторениях - *A. fumigatus*).

Автор (-ы) вида должен (-ны) быть указан (-ы) не только в заголовке к статье, но и при первом упоминании в тексте (если нет этого в заголовке) и в возможном списке видов. В подписях к рисункам и в надписях к таблицам полные названия рода и вида приводятся один раз.

Названия учреждений при первом упоминании в тексте даются полностью, и сразу же в скобках приводят их принятые сокращения, которыми пользуются в последующем тексте статьи, например, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (ГБОУ ВПО СЗГМУ), Московская государственная медицинская академия им. И.М. Сеченова (ММА им. Сеченова) и т.д.

Четко писать и различать О, о, и 0 (ноль), 1 и I (единицу и заглавную латинскую И), I и J, q и g, заглавные буквы О по-русски и Q по-английски. Подстрочные примечания должны иметь сквозную нумерацию по всей статье. Содержание таблиц не должно дублировать текст. Таблицы должны иметь порядковые номера, если их больше одной. Текст таблиц печатать через 2 интервала.

Все термины, употребляемые в статье, должны строго соответствовать действующим номенклатурам (анатомической, гистологической и т.д.), названия лекарственных средств - Государственной Фармакопее, единицы физических величин - международной системе единиц (СИ).

В тексте при ссылке на работу иностранных авторов их фамилии приводятся в русском написании и рядом в скобках - в оригинальном написании с указанием года опубликования работы, например: «Штайб (Staub, 1992) наблюдал...». Ссылки на работы располагать в хронологическом порядке годов опубликования работ.

Литература, упоминаемая в тексте (не должна быть старше 10 лет), приводится списком в конце статьи **в том порядке, в котором она цитирована в тексте работы;** соответствующие номера статей проставляются в тексте в квадратных скобках.

Рисунки (фото) должны иметь порядковые номера, на которые следует ссылаться в тексте статьи. Рисунки (фото) прилагаются в отдельном конверте (фотоснимки - в двух экземплярах) или в электронном виде. На микрофотографиях изображается масштаб, в подписях к ним необходимо указывать собственные увеличения объектива и окуляра, и, возможно, коэффициент усиления увеличения за счет дополнительных оптических приспособлений (например, для некоторых бинокулярных микроскопов x 1,5). На обороте рисунка указываются мягким карандашом без нажима фамилия автора, номер и желательное уменьшение рисунка (фото), верх рисунка.

Оформление списка литературы.

1. Для книг указываются фамилии и инициалы авторов, название книги, место издания (город), издательство, год, общее количество страниц, например: *Васильева Н.В., Елинов Н.П.* Микроорганизмы - контаминанты и патогены - индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей (учебное пособие) / Под ред. Н. П. Елинова. – СПб.: КОСТА, 2009. – 224 с.

2. Для статей, опубликованных в журналах, указываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название журнала, год, том, номер, первая и последняя страницы статьи, например: *Brinkman C., Vergidis P, Uhl J.* PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis // *J.of Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51, №7. – P. 2040-2046.

3. Для статей, опубликованных в сборниках, ука-

зываются фамилии и инициалы авторов, название статьи, название сборника, место издания (город), издательство, год, первая и последняя страницы статьи, например: *Елинов Н.П.* Низшие микромицеты и вызываемые ими микозы – беспокойная проблема будущего // Материалы 3-го Всеросс. конгресса по мед. микологии. – М., 2005. – Т. VI. – С. 44-46.

Для авторефератов диссертаций, например: *Хабидулина Ф.М.* Почвенная микобиота естественных и антропогенно нарушенных экосистем северо-востока европейской части России: Автореф. дисс... док. биол. наук. – Сыктывкар, 2009. – 40 с.

Редакция оставляет за собой право сокращать статьи и вносить редакционные исправления.

В случае возвращения автору рукописи статьи на переработку дата ее поступления сохраняется в течение 4 месяцев. При отклонении работы статья не подлежит возвращению автору.

В конце статьи, принятой к публикации, приводится фамилия рецензента.

Частота выпуска журнала: 1 номер в квартал, 1 том в год.

Все статьи публикуются бесплатно.

По вопросам размещения рекламы обращаться по адресу редакции (см. ниже).

Вся корреспонденция направляется по адресу: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28, НИИ ММ им.П.Н.Кашкина СЗГМУ им. И.И. Мечникова.

Тел: (812) 303-51-45;

тел./факс: (812) 510-62-77

E-mail: mycobiota@szgmu.ru;

egukova@mail.ru

Заведующая редакцией: Гукова Елена Станиславовна

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ СТАТЕЙ!

Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» автор статьи предоставляет Академии право использовать статью в любой форме и любым способом, предусмотренными п. 2 ст. 1270 Гражданского Кодекса Российской Федерации, в том числе: воспроизведение статьи; распространение статьи путем продажи или иного отчуждения его оригинала или экземпляров; сообщение в эфир; сообщение по кабелю; перевод или другая переработка статьи; доведение статьи до всеобщего сведения; передача права использования статьи третьим лицам (сублицензионный договор); извлечение и обработка метаданных статьи.

Автор статьи гарантирует, что он является обладателем передаваемых Университету прав (правообладателем).

Территория, на которой допускается использование прав на статью, не ограничена.

Передача прав на статью осуществляется без выплаты автору статьи вознаграждения.

Университет вправе использовать статью в течение срока действия исключительного права правообладателя на статью.

Автор предоставляет Университету право обработки своих персональных данных.

В связи с вышеизложенным, редакционная коллегия журнала «Проблемы медицинской микологии» просит авторов, **вместе с сопроводительным письмом от организации, присылать документ с текстом следующего содержания:**

«Направляя статью для размещения в журнале ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (далее – Университет) «Проблемы медицинской микологии» я (мы) _____ (указать ФИО) предоставляю (ем) Университету право использовать мою (нашу) статью _____ (название статьи) в любой форме и любым способом, указанном в «Правилах предоставления рукописей авторами» журнала «Проблемы медицинской микологии».

Сопроводительное письмо к статье должно быть написано и подписано собственноручно автором (авторами) статьи.



Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)
Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н.Кашкина (НИИ ММ) СЗГМИ им. И.И. Мечникова
 Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45, факс (812) 510-62-77
 E-mail: mycobiota@spbmapo.ru. Заведующая редакцией: Е.С.Гукова.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov
Kashkin Research Institute of Medical Mycology
 Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA. Tel.: (812) 303-51-45, Fax (812) 510-62-77
 E-mail: mycobiota@spbmapo.ru. Manager of Editorial Office: E.S.Gukova

«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»
 Рег. № 77-1396 от 20.12.1999 г. ISSN 1999-6780
 Журнал включен в реферативный журнал и базы ВИНТИ.
 Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

Оригинал-макет — НИИ «Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина СЗГМУ».
 Подписано в печать 29.12.2014. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.
 Усл. печ. л. 12. Тираж 999 экз.

Дорогие читатели нашего журнала!

**Члены редакционной коллегии и научно-редакционного совета
журнала «Проблемы медицинской микологии» сердечно
поздравляют Вас с Новым Годом и Рождеством!**

**Желаем всем хорошего здоровья, успехов в труде и быте,
счастья в содеянном и наслаждения в качественно творимом и
планируемом и, конечно же, в разносторонней любви к людям,
заслуживающим этого!!!**

