

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МУЧНИСТОЙ РОСЫ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Аветисян Г.А.

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, 127276, Москва

Активные формы кислорода играют важную роль в регуляции взаимодействия растения и патогена, что особенно интересно в случае биотрофного патогенеза. Изучали влияние окислительного стресса на развитие возбудителя мучнистой росы пшеницы *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*. Окислительный стресс моделировали обработкой отделенных листьев пшеницы экзогенной перекисью водорода и 3-амино-1,2,3-триазолом (3-АТА), ингибитором пероксидазы и каталазы, который способствует увеличению эндогенной перекиси водорода. Интактные нефиксированные образцы листьев исследовали с использованием сканирующего электронного микроскопа LEO-1430 VP (Carl Zeiss, Германия) в режиме низкого вакуума (VP mode).

Ранее нами было показано, что экзогенная перекись водорода ингибирует развитие изучаемого патогена. Для определения времени действия активных форм кислорода исследуемые вещества вносили в среду инкубации отделенных листьев через определенные промежутки после инфицирования и на ограниченный период (24 ч, в 1-е, 2-е, 3-и сут после инфицирования). Во всех экспериментальных вариантах наблюдали достоверное ингибирование патогена ($p < 0,001$), особенно сильное в условиях постоянного присутствия изучаемых веществ. Патоген ингибирующий эффект 3-АТА (рис.1) сопровождался формированием многочисленных нефункционирующих ростковых трубок и аномальным развитием колоний. При внесении перекиси водорода на ограниченное время ее ингибирующая активность была максимальной на 1-е и 3-и сутки, на вторые сутки ингибирующая активность была минимальной, а число колоний было достоверно больше чем в двух других вариантах. Сходные результаты были получены при обработке листьев пшеницы 3-АТА. Таким образом, ингибирующее действие веществ, моделирующих окислительный стресс, происходило на ранних этапах инфицирования (1 сут), что соответствует стадиям прорастания конидии, образования аппрессория и первичной гаустории.

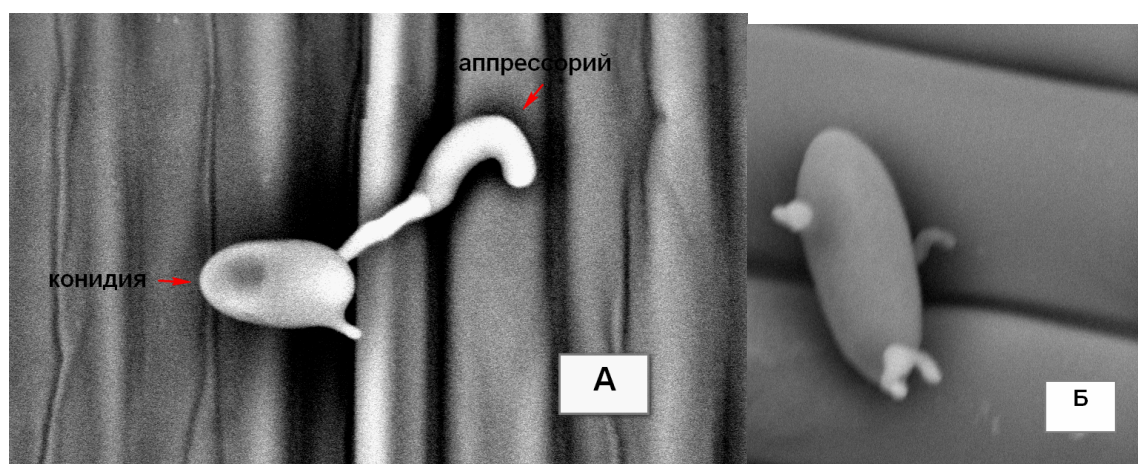


Рис.1. Развитие возбудителя мучнистой росы на листьях пшеницы через 24 ч после инфицирования (А - контроль, Б – 4 мМ 3-АТА, 1000х)

НОВЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ И ЕЕ АМИНОПОЛИСАХАРИДОВ У МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ.

Андриянова Д.А.¹, Мейчик Н.Р.², Николаева Ю.И.², Феофилова Е.П.¹

1 – Институт микробиологии имени Н.С.Виноградского РАН

2 – МГУ имени М.В.Ломоносова

Москва

Клеточная стенка (КС) мицелиальных грибов, открытая в начале 18-го столетия, длительное время не изучалась. В настоящее время клеточная стенка грибов интенсивно исследуется, и ее рассматривают как полифункциональную структуру, которая кроме опорной (скелетной) функции контролирует морфогенез, участвует в репродукции, определяет антигенные и адгезивные свойства. Особенно важное значение придается КС в стрессовых условиях и образовании специализированных покоящихся клеток, которые обладают способностью сохранять жизнеспособность при самых неблагоприятных внешних воздействиях.

Настоящее сообщение ставит своей целью показать, что кроме указанных выше функций, КС грибов, как и растений, обладает как катионообменными, так и анионообменными свойствами. Исследования проводили с мукоровым мицелиальным грибом *Cunninghamella japonica* при использовании оригинальной методики, позволяющей изучать КС грибов как целостную структуру без ее химической деструкции с использованием потенциометрического, неводного титрования и элементного анализа. Впервые показано, что КС грибов, как и растений, содержит аминокислоты с pK_a -3,5 – 4,0 и катионообменные группы с pK_a -8,5 – 9,0. Это позволяет КС грибов в зависимости от внешних условий быть природным катионо - или анионообменником.

В дальнейших исследованиях было установлено, что сохранение жизнеспособности мицелия Mucorales зависит от содержания в КС основных структурных аминополисахаридов. При действии стрессора, например, голодания происходит постепенная остановка ростовых процессов, которая сопровождается увеличением содержания хитина, значительным утолщением КС, что в дальнейшем сохраняет жизнеспособность культуры. Отмеченная закономерность подтверждается в опытах при добавлении к среде выращивания производного нуклеотид пептидных антибиотиков никкомицина, специфически ингибирующего биосинтез хитина, что приводит к резкому уменьшению толщины КС гриба, уменьшению уровня хитина и выхода биомассы. Другой ингибитор синтеза хитина – полиоксин D- приводит к разрывам на кончике гифы *C. japonica* и лизису культуры. В аспекте связи жизнеспособности клетки с содержанием хитина интересны данные о том, что при действии на культуру *C.japonica* низкой температуры (17 °С) отмечается ингибирование биомассы, уменьшается толщина КС и содержания хитина (практически в 3 раза в % от веса КС). Следует отметить, что при определенных стрессорных воздействиях жизнеспособность гриба зависит не только от содержания хитина, но и от степени его деацетилирования. Показано, что действие высоких концентраций кобальта вызывает утолщение КС, но ее основным биополимером становится хитозан (Venkatesvarlu et fl., 1986). Таким образом, к антистрессовым механизмам, сохраняющим жизнеспособность культуры, следует относить биосинтез хитина и наличие в грибной клетке его деацетилированной формы.

Тезисы поддержаны грантом РФФИ № 09-04-00430.

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ РОДА RYTHIUM

Бондарь Т.И.

Украинская лаборатория качества и безопасности продукции АПК

Киев, Украина

Среди возбудителей инфекционных заболеваний растений, грибы наиболее численная группа. Они отличаются между собой по систематическому положению, особенностям развития, степени паразитизма, специализацией и т.д. Основная часть грибов, за исключением облигатных паразитов, может выращиваться в лабораторных условиях, с целью исследования биологических и морфологических особенностей, моделирования процесса заражения, исследования патологического процесса, и т.п.

Возбудителем чёрной ножки и корневых гнилей крестоцветных, в частности рапса, являются грибы рода *Rythium*. Они относятся к классу Оомицетов, в цикле развития которых, отсутствует образование конидиального спороношения на воздушном мицелии. Основную роль в патологическом процессе играют ооспоры, при прорастании которых в капле воды образуется множество зооспор, вызывающих поражения растений. В то же время вид *Rythium ultimum* var. *ultimum* крайне редко образует зооспоры. Работа с таким микромицетом довольно усложнена. Так, невозможно рассчитать инфекционную нагрузку при проведении искусственного заражения, да и сам процесс заражения исключает возможность использования суспензии спор, что является самым простым и нетрудоемким, а требует применения более совершенных методов. Возникают также трудности с выделением гриба в чистую культуру и его сохранения.

Изучение биологических особенностей *Rythium ultimum* var. *ultimum* позволило установить ряд факторов облегчающих дальнейшую работу с грибами этого рода.

Выделение в чистую культуру лучше всего проводить на бедных по своему составу питательных средах: голодном агаре или стерильной воде. В случае наличия сопутствующих, быстро растущих грибов, лучше использовать голодный агар, который к тому же может позволить получить сразу монокультуру. И в первом, и во втором случае, допустимо использование незначительных доз антибактериальных препаратов и бенгальского розового, угнетающего рост сопутствующих микромицетов, в частности *Fusarium*. В стерильной воде на 3-5 день отбирается нижняя часть мицелия стелющегося по дну чашки Петри, на голодном агаре – вырезаются участки среды с чётко выраженными ооспорами. Данные операции лучше проводить при небольшом увеличении (2,5 – 20х).

Для работы с грибами, в зависимости от цели, используются различные среды. Так для получения большого количества плодовых структур (ооспор), за короткий промежуток времени, лучше использовать овсяный агар, позволяющий на 5-8 день получить до 200-350 ооспор в одном поле зрения микроскопа при стократном увеличении. Эта же среда вполне пригодна для хранения культуры. Используя чашки Петри с очень тонким слоем овсяного агара, который высыхает через 8-16 дней, можно получить тонкую плёнку содержащую в себе значительное количество ооспор в покоящемся состоянии. В таком виде гриб может храниться более года. Для посева достаточно на поверхность плёнки нанести несколько капель стерильной воды и размягчившуюся часть перенести в новую чашку. Как показали наши исследования *R. ultimum* var. *ultimum* не терял своих патогенных свойств даже после трёхлетнего хранения.

Для поддержания культуры достаточно использовать картофельно-глюкозный агар, который позволяет длительное время выдерживать культуру гриба в стабильных условиях, не истощая его.

Таким образом, ориентируясь на наиболее постоянные плодовые структуры грибов этого класса, используя микроскоп малого увеличения для подсчёта ооспор и оценки состояния культуры, можно расширить круг исследуемых возбудителей корневых гнилей.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК ГРИБАМИ РОДА *CANDIDA* ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА

Валышев А. В., Валышева И. В., Гейде И. В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

Оренбург

Биопленки представляют собой скопления микроорганизмов (бактерий, грибов и/или простейших), включенные в полисахаридный матрикс и связанные с плотной основой на биологической или небиологической поверхности. По данным Национального Института здоровья (НИН) США, биопленки имеют большое клиническое значение, определяя более 80 процентов инфекционных процессов в организме человека. Микроорганизмы, ассоциированные с биопленками, более устойчивы к антимикробным факторам хозяина, антибиотикам и дезинфектантам [Ильина и др., 2004].

Получен большой фактический материал о способности патогенных грибов образовывать биопленки при инфекционных процессах и на различных медицинских изделиях, об устойчивости биопленок к противогрибковым лекарственным средствам [Dominic et al., 2007; Růzicka et al., 2007; Ramage et al., 2006; d'Enfert, 2006]. Однако практически отсутствуют данные об этом свойстве у представителей рода *Candida* кишечной микрофлоры человека.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности образования биопленок дрожжевыми грибами рода *Candida* фекальной микрофлоры человека.

В работе использованы 45 культур дрожжевых грибов рода *Candida* (*C. albicans* – 23 штамма; *C. krusei* и *C. lusitaniae* – по 3 штамма; *C. inconspicua*, *C. pelliculosa*, *C. famata* 3 и *C. guilliermondii* – по 1 штамму) из фекалий пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника. Выделение микроорганизмов проводили на среде BiGGY Agar (Becton, Dickinson and Company, США). Идентификацию дрожжевых грибов проводили на основании микроскопии, а также результатов тестов на ферментацию и ассимиляцию с помощью тест-системы CANDIDAtest 21 (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., Чехия).

Для определения способности микроорганизмов к образованию биопленок изучали степень связывания кристаллического фиолетового последними в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах [Merritt et al., 2005]. Уровень активности рассчитывали как отношение $A_{540\text{опыт}}/A_{540\text{контроль}}$; положительным результатом считали значения более 1,1. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Подавляющее большинство штаммов грибов рода *Candida* образовывали статические биопленки в лунках полистироловых планшетов. Хотя частота образования биопленок у культур *C. albicans* и группы *Candida spp.* (не *albicans*) была сопоставима (около 90%), средний уровень признака во второй группе был достоверно выше, чем в первой ($2,75 \pm 0,53$ против $1,38 \pm 0,11$, $p < 0,05$). Наиболее высокие значения данного свойства были отмечены у дрожжевых грибов *C. krusei* ($6,75 \pm 1,65$) и *C. pelliculosa* (7,22). Другие грибы (*C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. inconspicua*, *C. famata* 3) имели более низкую способность к образованию пленок – соответственно $2,03$, $2,21 \pm 0,18$, $2,54$ и $2,83$.

Полученные результаты свидетельствуют, что дрожжевые грибы фекальной микрофлоры обладают способностью образовывать биопленки, причем это характерно как для основного возбудителя микозов – вида *C. albicans*, так и для других представителей данного рода. Высокие значения признака у *C. krusei* согласуются с данными других авторов о выраженной способности к образованию биопленок у грибов данного вида [Mukherjee et al., 2005]. Способность к образованию биопленок грибов кишечника способствует их персистенции в нижних отделах пищеварительного тракта и приводит к развитию дисбиотических состояний и эндогенных инфекций.

ИЗМЕНЕНИЕ ПУЛА ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ СТРЕССА

Войчук С.И., Громозова Е.Н., Остапчук А.Н., Клочко В.В.

Институт микробиологии и вирусологии НАНУ

Киев, Украина

Клетки дрожжей способны приобретать устойчивость к ряду фунгицидных антибиотиков полиенового и азолового рядов в результате воздействия неионизирующего радиочастотного электромагнитного излучения (ЭМИ). Известно, что изменение состава жирных кислот клеток дрожжей может приводить к резистентности по отношению к полиеновым антибиотикам. В данной работе было исследовано влияние неионизирующего электромагнитного излучения (40,68 МГц, 30 Вт, экспозиция 5, 15 и 30 мин. при комнатной температуре), фунгицидного антибиотика нистатина (2,5, 5 и 7,5 мкг/мл) и температуры (28, 37 и 46 °С, экспозиция 10 мин.) на состав жирных кислот клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-517. Методом газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии оценивали процентное содержание гексадеценовой (C16:1) и гексадекановой кислот (C16:0), цис-октадеценовой (cisC18:1) и октадекановой кислот (C18:0). Отмечено, что из трех исследованных факторов, ЭМИ обладало наибольшим эффектом и приводило к статистически значимым ($p \leq 0,005$) изменениям содержания C16:0 и cisC18:1, а также C18:0 ($p \leq 0,08$). Присутствие нистатина сказывалось на содержании C16:0 ($p \leq 0,01$) и C18:0 ($p \leq 0,1$). Кратковременное температурное воздействие влияло на C16:0 ($p \leq 0,08$) и cisC18:1 ($p \leq 0,1$). Таким образом, C16:0 оказалась наиболее чувствительной, хотя и в разной степени, к действию всех трех факторов. C18:0 была абсолютно не чувствительной к воздействию температуры, а cisC18:1 к присутствию нистатина. Ни один из исследованных факторов не оказывал воздействия на процентное содержание в клетках дрожжей C16:1. Таким образом, изменение состава жирных кислот в дрожжевых клетках в результате воздействия неионизирующего ЭМИ радиочастотного диапазона может служить причиной резистентности микроорганизмов к некоторым фунгицидным антибиотикам.

ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТЬ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Голубев В.И.

Всероссийская коллекция микроорганизмов

Пушино

В последние годы в качестве возбудителей микозов все чаще обнаруживают виды дрожжевых грибов, никогда ранее не регистрировавшиеся как патогены. Описано даже немало уже случаев заболеваний, вызванных пекарскими, пивными и винными дрожжами, являющимися расами одного биологического вида *Saccharomyces cerevisiae* (= *Sacch. boulardii*). Хотя эти случаи присущи пациентам с ослабленным иммунным статусом, сами патогенные культуры сахаромикетов также характеризуются рядом свойств, обуславливающих, повидимому, их вирулентность (повышенная энзиматическая активность, адгезия, образование мицелиальных структур). К числу их относится, несомненно, и способность расти при повышенных температурах, по крайней мере, при 37°C или выше. Относительное содержание таких штаммов сахаромикетов, выделенных не из клинических образцов, а в основном, из пищевых продуктов или окружающей среды, невелико. Среди обследованных нами более 420 штаммов *Sacch. cerevisiae*, поддерживаемых в ВКМ (<http://www.vkm.ru>), лишь около 5% их, включая неатиповой штамм вида, способны расти при 37°C (сусло-агар). Из них половина культур могла расти и при 40°C, из которых два штамма обнаруживали слабый рост при 41°C. Ни один из проверенных штаммов не рос при 42°C.

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК КЛИНИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ CANDIDA ALBICANS ПРИ ДИСБИОЗЕ КИШЕЧНИКА.

Гордеева С.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Фадеев С.Б.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

Оренбург

В настоящее время формирование биопленки рассматривают как один из механизмов резистентности микроорганизмов к антимикробным агентам и факторам иммунитета (Raad I., 1998). Считают также, что биопленка – защищенная ниша для бактерий и грибов, где они в безопасности от антибиотиков и антимикотиков и могут создать источник рецидивирующей инфекции (Mukherjee P., 2005). Кандидозные биопленки рассматривают как потенциальную причину резистентности микромицетов к антимикотикам (Mukherjee P., 2004), однако данные по образованию биопленок штаммами *Candida albicans* крайне ограничены.

Целью работы явилось изучение способности формирования биопленок культурами *Candida albicans* выделенных при эубиозе и дисбиозе кишечника человека.

Материалом для данной работы послужили 14 штаммов *Candida albicans*, изолированных из фекалий пациентов с эубиозом и дисбиозом кишечника I - III степени. Выделение микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами с использованием элективных и дифференциально-диагностических сред. Идентификацию грибов проводили по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам с использованием коммерческих тест-систем API20CAUX (Biomérieux, Франция). Образование биопленок исследовали с помощью определения способности штаммов дрожжевых грибов к адгезии на поверхности 96-луночной полистероловой планшеты (Шагинян И.А., 2007). Измерения оптической плотности производили на фотометре ELx808 (BioTek, США). Результаты выражали в единицах оптической плотности (ед. ОП). Образование биопленок считали положительным при значениях оптической плотности выше значений контроля (питательный бульон). Данные приведены после четырехкратной повторяемости результатов.

Результаты: исследуемые штаммы *Candida albicans* обладали способностью к образованию биопленок в 78,6% случаев. В 21, 4% случаев образование биопленок у культур *Candida albicans* отсутствовало. Значения оптической плотности различных штаммов варьировали от 0,071 до 0,438 ед. ОП. Средний показатель пленкообразования у дрожжевых грибов составлял 0,188 ед. ОП. При I степени дисбиоза способность образовывать биопленки *Candida albicans* в среднем составляла 0,14 ед. ОП, при II степени – 0,15 ед. ОП., при III степени – 0,226 ед. ОП. При эубиозе ни один исследуемый штамм не образовывал биопленки.

Заключение: таким образом, установлено, что большинство клинических штаммов *Candida albicans*, изолированных при дисбиозе кишечника, способны образовывать биопленки. Данный признак варьирует у культур грибов и зависит от состояния микробиоценоза кишечного биотопа. Полученные данные расширяют представления об адаптивной способности грибов в условиях макроорганизма и их устойчивости к факторам естественной резистентности хозяина и антимикотическим агентам различного происхождения. Имеющиеся сведения необходимо учитывать при подборе противогрибковых препаратов для эффективной элиминации грибных патогенов.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ BIFIDOBACTERIUM SPP. НА СПОСОБНОСТЬ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКИ ШТАММАМИ CANDIDA ALBICANS.

Иванова Е.В., Явнова С.В., Перунова Н.Б., Андрищенко С.В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

Оренбург

Доминантными автохтонными обитателями кишечного биотопа, участвующими в формировании микробиоценоза и определяющими состояние колонизационной резистентности, являются бифидобактерии. При снижении их численности наступает состояние дисбиоза, одним из признаков которого является увеличение численности *Candida spp.* (Шендеров Б.А., 2007). Способность *Candida albicans* образовывать биопленки в настоящее время считается одним из важных признаков вирулентности гриба (Mukherjee P., 2004, 2005). Однако вопрос о возможности регулирования процесса пленкообразования у грибов представителями нормофлоры, а именно бифидобактериями, остаётся открытым.

Целью работы явилось изучение влияния экзосометаболитов бифидобактерий на способность формировать биопленки штаммами *Candida albicans*, изолированными при дисбиозе кишечника человека.

В работе использованы 4 штамма бифидобактерий (по 2 культуры *B. bifidum* и *B. adolescentis*) и 14 штаммов *Candida albicans*, изолированных из фекалий пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника. Выделение микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами с использованием элективных и дифференциально-диагностических сред. Идентификацию бактерий и грибов проводили по морфологическим, культуральным и биохимическим признакам с использованием коммерческих тест-систем «Anaerotest-23» (Lachema, Чехия) и «API20CAUX» (Biomeriux, Франция). Образование биопленок исследовали с помощью определения способности штаммов дрожжевых грибов к адгезии на поверхности 96-луночной полистероловой планшеты (Шагинян И.А., 2007). Изучение влияния экзосометаболитов бифидобактерий на способность дрожжевыми грибами образовывать биопленки проводили путем добавления полученного фильтрата анаэробов в лунки с питательным бульоном в соотношении 1:10 и вносили чистую культуру условно-патогенных микроорганизмов. В контрольные пробы вместо фильтратов бифидобактерий использовали питательный бульон. Измерения оптической плотности производили на фотометре ELx808 (BioTek, США).

Результаты: отмечен разнонаправленный эффект воздействия экзосометаболитов бифидобактерий на образование биопленок штаммами *Candida albicans*. Культуры *B. adolescentis* угнетали пленкообразование грибов в 45,4% случаев в среднем на 28,6% от исходных значений свойства. Стимулирующее воздействие экзосометаболитов отмечено в 36,4% случаев в среднем на 33,7% от первоначального уровня. Отсутствие влияния наблюдалось в 18,2% случаев. Штаммы *B. bifidum* снижали способность грибов к пленкообразованию в 50% случаев в среднем на 31,8% от исходных значений контроля. Увеличение показателя образования биопленок было в 36,4% случаев в среднем на 27,1% от исходных значений. В 13,6% интенсивность пленкообразования *Candida albicans* не изменялась.

Заключение: таким образом, установлено, что экзосометаболиты бифидобактерий способны влиять на интенсивность образования биопленок *Candida albicans*. Изменение данного показателя носит разнонаправленный характер. Культуры *B. bifidum* обладают более высокой способностью ингибировать пленкообразование грибов, чем штаммы *B. adolescentis*. Полученные данные способствуют расширению представлений об ассоциативном симбиозе и формировании микробиоценоза при эубиозе и дисбиозе кишечного биотопа. Имеющиеся сведения необходимо учитывать при коррекции дисбиотических состояний кишечника обусловленных дрожжевыми грибами рода *Candida*.

ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ НА ПРОРАСТАНИЕ КОНИДИЙ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Казакова Е. В., Кузнецова Л.С.

Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Москва

Анализ микрофлоры мясоперерабатывающих и сыродельных предприятий РФ показал, что на поверхности мясных и молочных продуктов и в воздухе производственных помещений перерабатывающих предприятий АПК чаще других обнаруживаются мицелиальные грибы рода *Penicillium*.

При исследовании были использованы штаммы новых грибов, выделенных нами с поверхности твердых сыров, копченых колбас и из воздуха производственных помещений: *Penicillium roqueforti* ВКМ FW-3072; *Penicillium chrysogenum* ВКМ FW-3088; *Eurotium amstelodami* ВКМ FW-3085.

На первом этапе работы проводились исследования по влиянию различных компонентов питательных сред (стимуляторов) на прорастание конидий выделенных штаммов. Изучение действия стимуляторов показало, что компоненты питательных сред влияют как на скорость, так и на процент прорастания конидий изучаемых штаммов. Средняя скорость прорастания конидий составляет: для *P. roqueforti* - 10-11 ч., для *P. chrysogenum* - 11-12 ч. и для *E. amstelodami* - 13-14 ч. На молочной сыворотке, выбранной в качестве контроля, были получены наилучшие результаты как по скорости прорастания конидий (10-11 ч для *P. roqueforti*, 12 ч - для *P. chrysogenum* и 13-14 ч - для *E. amstelodami*), так и по числу проросших спор – 70%, 60% и 65% соответственно. На среде Блюменталья-Розмана, взятой также в качестве контроля, у всех испытуемых штаммов оба параметра были существенно ниже: 1% у *P. roqueforti*, 0,5% у *P. chrysogenum* в течение 12 ч, и 50% у *E. amstelodami* в течение 14 ч.

При изучении азотосодержащих сред, где азот использовался в форме мочевины, L-пролина и пептона, на протяжении 24 ч наблюдения отмечалось следовое количество проросших спор. Однако даже незначительное добавление глюкозы или пептона к среде, содержащей 0,2% L-пролина, приводило к увеличению процента проросших спор.

Обнаружен весьма интересный факт: глюкоза, используемая нами в качестве источника углерода, стимулировала прорастание только конидий *P. chrysogenum*. Процент проросших спор данной культуры составил 40% за 12 ч. На другие культуры глюкоза не оказывала иницирующего воздействия. Кроме того, из всех испытуемых сред штамм гриба *P. roqueforti*, поражающий поверхность твердых сыров, прорастал только в молочной сыворотке.

Дальнейшие исследования проводились со спорами гриба *P. chrysogenum*, наиболее активно поражающего поверхность мясных продуктов. Для опытов использовали питательные среды, включающие следующие пищевые ингредиенты: композиции на основе животного и растительного белка, полисахариды морских водорослей, камеди. Результаты работы показали, что процент прорастания спор при инкубировании выбранного штамма с использованием пищевых добавок на основе животного и растительного белка практически достигал 90% за время, равное 10-12 ч. На средах, содержащих полисахариды морских водорослей, были получены более низкие показатели по числу проросших спор: 25-30% через 12ч культивирования. Наилучшее прорастание конидий *P. chrysogenum* было отмечено в случае использования сред с добавлением камеди: за 9 ч процент проросших спор составил 90%.

Полученные данные являются основой для компетентной разработки новых защитных противоплесневых покрытий для деликатесной мясной продукции.

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ГРИБОВ РОДА *COCCIDIOIDES* Лесовой В.С., Липницкий А.В., Гришина М.А., Вьючнова Н.В., Кочубеева Е.Н., Ткаченко Г.А., Антонов В.А.

ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора
Волгоград

В настоящее время к возбудителям кокцидиоидомикоза относят два вида грибов из рода *Coccidioides* – *C. immitis* и *C. posadasii* [Fisher M. et al., 2002]. Несмотря на выраженные генетические различия между ними, доказательств отличий фенотипических свойств и вирулентности штаммов обоих видов пока не получено [Cox R., Maggee D., 2004].

Генетический анализ 25 штаммов *Coccidioides spp.*, имеющих в коллекции Волгоградского НИПЧИ, показал, что 11 из них относятся к *C. immitis*, а 14 — к *C. posadasii* [Г.А. Ткаченко с соавт., 2007]. Представлялось интересным провести сравнительную оценку вирулентности штаммов этих видов, длительное время (более 40 лет) сохраняющихся в коллекционном центре Волгоградского НИПЧИ путем периодических пересевов на питательные среды.

Известно, что вирулентность штаммов *Coccidioides spp.* для мышей, несмотря на значительные штаммовые различия, является стабильным признаком. По данным Friedman L. et al (1956), культуры гриба, сохраняемые на агаровых средах, оставались вирулентными до 16 лет после первичного выделения. Более того, сниженная вирулентность может быть восстановлена как *in vitro* путем пересевов на обогащенных питательных средах, так и *in vivo* путем пассирования через организм экспериментальных животных.

В качестве объектов исследования были использованы штаммы *C. immitis* и *C. posadasii*, выращенные в течение 30 суток при 28°C на агаре Сабуро. Исследуемые культуры микромицетов суспендировали в 0,15 М растворе NaCl. Для отделения артроспор от фрагментов мицелия полученные суспензии фильтровали, после чего определяли КОЕ и проводили внутрибрюшинное заражение белых мышей дозами от 1×10^2 до 1×10^7 артроспор/мл, по 10 особей на каждую дозу. Зараженных мышей наблюдали в течение одного месяца. Наличие у животных кокцидиоидомикоза подтверждали выделением культур *Coccidioides spp.* из внутренних органов (легкие, печень, селезенка); одновременно отмечали патологические изменения в тканях павших зверьков. LD50 различных штаммов оценивали по методу Рида и Менча.

Результаты опытов показали, что LD50 штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза, независимо от вида, колебалась от 1×10^3 до 1×10^7 . Среди обоих видов преобладали штаммы с обильным и умеренным спорообразованием. Не установлено зависимости между вирулентностью и интенсивностью артроспорообразования.

Скорость развития и интенсивность инфекционного процесса у животных значительно отличались в зависимости от штамма, но не видовой принадлежности.

Таким образом, при сравнительной оценке вирулентности штаммов двух видов *Coccidioides spp.* не выявлено различий по вирулентности и морфологическим характеристикам. Многолетнее сохранение штаммов *Coccidioides spp.* путем посева на питательные среды, очевидно, приводит к снижению вирулентности, хотя некоторые из них сохранили достаточно высокую степень вирулентности для белых мышей.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *CANDIDA ALBICANS*.

Лисовская С.А., Глушко Н.И.

Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии

Казань

C. albicans, как условно-патогенные грибы, в организме хозяина растут в дрожжевой форме, но могут переходить в мицелиальную форму, особенно при снижении иммунитета хозяина, и проникая в ткани, вызывать тяжелые формы кандидоза. Внедрение *C. albicans* в эпителий кожи и слизистых оболочек всегда сопровождается изменением морфологической фазы гриба с формированием ростковых трубок и псевдомицелия. С переходом из одной фазы в другую изменяется строение клеточной стенки, при этом, возможно, изменяются адгезивные свойства гриба. Ранее нами были изучены клинические штаммы *C. albicans* и показана зависимость адгезивных свойств гриба, как от формы и тяжести заболевания, так и от условий проведения культивирования (качества питательной среды, температуры, время инкубирования и количества пассажей проведенных после выделения гриба). В связи с этим представляет интерес оценить взаимосвязь между способностью клеток гриба формировать ростовые трубки и его способностью к адгезии, как первоначальному этапу колонизации. А также изучить влияние различных источников углерода (галактоза, глюкоза, крахмал, желток, в отсутствие сахаров) в составе питательных сред на активизацию гифообразования. В исследование были отобраны один музейный – «непатогенный» и 15 клинических штаммов *C. albicans* трех групп (низким, средним, высоким уровнем адгезии). Штаммы выделены из ротовой полости у больных в период первичного и обострения хронического заболевания, а также из ротовой полости у пациентов в отсутствие клинических признаков инфекции. Для образования герминативных трубок, культуру клеток *C. albicans* вносили в пробирку с 0,5-1 мл среды №199 и инкубировали при 37⁰С в течение 1,5-3 часов. После инкубации каплю содержимого исследовали под световым микроскопом при увеличении 10х40.

Культивирование штаммов *C. albicans* в отсутствие сахаров показало снижение способности гифообразования у штаммов с высоким уровнем адгезии более чем в три раза, а у штаммов с низким уровнем адгезии и музейного оно вообще отсутствовало. Наибольшую стимуляцию на все виды штаммов оказывали среды, содержащие в качестве источников углерода галактозу и глюкозу. Штаммы *C. albicans* выращенные на желточной среде, проявляли повышенную способность к множественному сферическому почкованию.

Кроме того, изучение штаммов *C. albicans* с низким, средним, высоким уровнем адгезии выявило различия в их способности к гифообразованию. Степень проявления диморфизма гриба была связана с адгезивной способностью. Максимальный процент герминативных трубок отмечался у штаммов с высоким уровнем адгезии, выделенных из ротовой полости у больных в период обострения хронического заболевания уже через тридцать минут инкубации культуры клеток. В то время как штаммы с низким уровнем адгезии, выделенные из ротовой полости у пациентов в отсутствие клинических признаков инфекции и музейный штамм, герминативные трубки образовывали только после 2,5 часа инкубации, причем более чем в десять раз меньше или в единичном количестве по сравнению со штаммами проявляющие высокую адгезивную способность.

Таким образом, штаммы *C. albicans*, выделенные от наиболее тяжелых больных с длительным течением заболевания обладают высокой адгезивной и инвазивной способностью. Трансформация дрожжевой фазы в мицелиальную зависит не только от внешних условий (особенности состава питательных сред), но, в основном, и от свойств самого гриба.

ВЫЯВЛЕНИЕ СИМПАТРИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ У *BOTRYTIS CINEREA* ПО РЕАКЦИЯМ ВЕГЕТАТИВНОЙ СОВМЕСТИМОСТИ

Лихачев А.Н.

МГУ имени М.В. Ломоносова

Москва

Субпопуляции грибов представлены мозаикой клонов, различающихся комплексами биологических свойств, а фитопатогенные виды наряду с этим - по патогенности (вирулентности) и специализации к растениям – хозяевам. Кроме географической изоляции видов и их популяций, у грибов существует ряд механизмов, обеспечивающих генетический разрыв связей или ограничение этого обмена за счет гомогенной (половой) несовместимости, если имеется данная стадия в цикле развития, цитоплазматической, ядерной, а также, более широко распространенной у разных таксономических групп, вегетативной (гетерогенной), приводящих к появлению внутривидовых специализированных групп штаммов, локальных популяций, в итоге приводящее к начальному этапу видообразования. Репродуктивная изоляция при разных типах проявления вегетативной совместимости приводит к распаду популяции на интерстерильные или вегетативно совместимые (v - c) анастомозные группы.

Анализ выборок штаммов (от 20-50) *Botrytis cinerea* с дикорастущих и культивируемых растений и полученных от них моноспоровых культур (по 30 штаммов) на основании морфометрических признаков, превалирования развития в колонии воздушного мицелия, интенсивности спороношения и формирования склероциев, окраски и пигментации среды позволил выделить четыре культурально-морфологических типа (КМТ). Первоначально выделенные изоляты в своем большинстве являются нестабильными культурами. В колониях *B. cinerea*, можно отметить выщепление отдельных секторов или островков с доминированием развития той или иной морфологической структуры – аспорогенных участков прижатого субстратного мицелия, склероциев, интенсивного спороношения и т.д.. С ряда субстратов, на пример семян клена, пустул ржавчины копытня, выделяются склероциальные склероциальные типы. При сращивании изолятов *Botrytis* и их моноспоровых штаммов (в зависимости от вариантов от 19 до 600 пар), выделенных с разных растений - хозяев выявлено несколько типов проявления реакций вегетативной совместимости и несовместимости. В агросистемах, на поражаемых серой гнилью культивируемых видах растений, а также дикорастущих хозяевах (земляника, малина и др.), у которых превалирует вегетативное размножение, в выборках штаммов *B. cinerea* проявляется тенденция сокращения числа КМТ и проявления несовместимых реакций между парами сращиваемых культур, выделенных с одного растения – хозяина. Выровненный по генетической устойчивости фон растений – хозяев и наличие одной группы совместимых штаммов при благоприятных гидротемпературных условиях создают предпосылки для эпифитотийного развития болезни как в агросистемах, так и природных условиях особенно на вегетативно размножающихся растениях. Более разнообразно проявление типов реакций между изолятами и моноспоровыми штаммами *B. cinerea* как с выделенных в разный период вегетации с дикорастущих хозяев, относящихся к разным семействам, так и между штаммами с «диких» и культурных растений. Вероятно, что на определенных видах как дикорастущих и культивируемых растений может происходить дивергенция субпопуляции на отдельные локальные популяции, являющиеся первым этапом внутривидового разнообразия и зарождения видов. Это положение подтверждается с использованием генетических методов исследований, показавших их наличие в субпопуляции *B. cinerea* на плантациях винограда, томатов, киви и ряда других культурах. Одна симпатрическая популяция представлена штаммами *transposa*, содержащими транспозоны *Boty* and *Flipper*, другая - *Vacuta*, у которых они отсутствуют. Штаммы несущие мобильные элементы *transposa* более адаптированы к поражению винограда, по сравнению с другими культурами (Giraud et al,1999; Levis, 2003; Martinez et al.2003). Реакции вегетативной несовместимости,

вероятно, снижают появление гибридных форм, что приводит к сужению специализации и способствует появлению новых симпатрических популяций.

ВОЗРАСТАНИЕ АКТИВНОСТИ БЕТА-ГЛЮКОЗИДАЗЫ КУЛЬТУРЫ *Pleurotus ostreatus* В ОТВЕТ НА СТРЕССОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Минасбекян Л.А, Нанагюлян С.Г., Авагян И.А.

*Ереванский государственный университет, биологический факультет
Ереван, Армения*

Биополимеры клеточных стенок высших грибов представляют большой интерес, поскольку в них обнаружено высокое содержание полисахаридов, обладающих выраженной антираковой активностью, и растительных ферментов, присущих только некоторым видам растений. В дереворазрушающих грибах содержится фермент бета-глюкозид глюкогидролаза, обычно называемый бета-глюкозидазой, катализирующий гидролиз алкил- и арил-бета-глюкозидов, таких как диглюкозиды и олигосахариды. Этот фермент широко используется в различных биотехнологических процессах: для производства горючего этанола из целлюлозных сельскохозяйственных остатков, для получения различных ароматических веществ в пищевой промышленности. бета-глюкозидаза является ключевым ферментом в ферментативном высвобождении ароматических соединений из глюкозидных предшественников, представленных в фруктах и ферментативных продуктах. бета-глюкозидазы могут также улучшать органолептические свойства цитрусовых фруктовых соков, в которых горечь обусловлена содержанием глюкозидного соединения: наринджином. Добавление экзогенной бета-глюкозидазы в течение или после ферментации в технологических процессах получения вин оказывается более эффективным для улучшения гидролиза глюкозосвязанных ароматических компонентов с целью улучшения аромата вина. Исследования и поиск других растительных и грибных источников β -глюкозидаз, толерантных к ингибированию глюкозой, продолжается. Возможно, модификации условий выращивания также могут привести к получению устойчивых форм фермента.

В данной работе нами использованы различные частоты крайне высоких частот электромагнитного излучения для модуляции условий произрастания культуры гриба *Pleurotus ostreatus* (Jack.: Fr.) Kumm. Чистая культура гриба была получена из заранее обработанных плодовых тел свежесобранных грибов, растущих на пнях широколиственных деревьев в Иджеванском флористическом районе. Кусочки тканей из разных частей плодового тела (шляпки, ножки и гименофора) в стерильных условиях переносили на твердую питательную среду в чашках Петри. В качестве питательной среды использовали агаризованное пивное сусло. С целью получения культуры гриба с повышенной ферментативной активностью нами были использованы крайне высокие частоты ЭМИ в диапазоне 45-53 ГГц при различных экспозициях и получены культуры с высокой активностью бета-глюкозидазы. При обработке культуры частотой 49 ГГц длительностью в 20 мин активность фермента бета-глюкозидазы возрастает в 2 раза, а обработка частотой в 51,8 ГГц с экспозицией в 20 мин приводит к возрастанию в 1.2 раза.

Нами предполагается в дальнейшем использовать такие возможности для модуляции условий выращивания культуры с целью получения высокопродуктивных штаммов гриба *Pleurotus ostreatus* (Jack.: Fr.) Kumm. с высоким содержанием фермента, толерантного к ингибированию глюкозой, для использования его в качестве дешевого экологически чистого сырья.

АССОЦИАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЁНКИ ОБРАСТАНИЯ НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ

Мирошниченко И.И., Зачиняев Я.В., Зачиняева А.В.

Российская Военно-Медицинская академия

Санкт-Петербург, Россия

Загрязнение почв синтетическими полимерами ведёт к антропогенной трансформации микробных сообществ биогеоценоза - потере природного видового разнообразия. Результатом формирования такого «трансформированного» микробного сообщества является образование биоплёнки на полимере. Биоплёнки - это сообщество поверхностно-ассоциированных микробных клеток, заключённых в экстрацеллюлярный полимерный матрикс. В природных условиях организмы существуют и проявляют свою активность, как правило, в ассоциациях, которые могут изменяться под воздействием привносимых в биосферу новых, ранее не существовавших объектов, например, синтетических полимерных материалов и изделий из них.

Цель работы – исследование ассоциации почвенных микроорганизмов, участвующих в формировании биоплёнки обрастания на простых полиуретанах трёхмерного (образец 1) и линейного строения (образец 2).

В работу были взяты: Обр. 1 - лесная дерново-подзолистая почва в окрестностях г. Советска (Калининградская обл.); Обр. 2 - тёмно-серый, пылеватый суглинок (Орловская обл., деревня Большое Сотниково); Обр. 3 - торфянисто-дерново-подзолистая почва (Ленинградская обл., Выборгский р-он, окрестности п. Рошино). Полиуретановые гранулы были помещены в почву на 2 года ($T = 18-20^{\circ}C$).

Поверхность полимера была исследована с помощью сканирующего электронного микроскопа «JMS-5400 (Jeol)», образцы полимера были наклеены на двухстороннюю углеродную клейкую ленту и покрыты напылённым в вакууме слоем золота.

Электронная микроскопия исходных образцов полиуретана показала, что оба образца полимера характеризуются глобулярным типом надмолекулярных структур. В процессе биодеструкции полимера тип этих структур остаётся таким же, но изменяются размеры глобулярных структур. Образцы полиуретана в результате инкубации в почвенном образце 1 покрылись мощной биоплёнкой, представленной грибами *Penicillium lilacinum* Thom, *Trichoderma harsianum* и *Fusarium oxysporum* Schlechtendal ex Fries. На образцах полиуретана в результате инкубации в почвенном образце 2 отмечалось развитие псев-домицелия актиномицетов и мицелия грибов: *Verticillium terrestre* Link, *Cylindrocarpon* sp., *Gliocladium catenulatum*. На полимерных образцах, прошедших инкубацию в почвенном образце 3 ассоциация почвенных микроорганизмов была представлена *Sporotrichum roseolum* Oudem & Beij., *Chrysosporium pannorum* (Link) Hughes, *Trichoderma viridae* Rifai, *Bacillus* sp.

Таким образом, рост микроорганизмов на образцах полиуретана был отмечен в виде биоплёнки, которая на 25-50 % покрывала исследуемые образцы после их инкубации в почве. После снятия биоплёнки с поверхности полимера на его поверхности были видны отбелённые в виде борозд и выступов участки.

Следует отметить, что тип почвы влияет на состав ассоциации микроорганизмов, выделенных с полиуретана.

ИЗУЧЕНИЕ МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НЕКОТОРЫХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ, ИМЕЮЩИХ МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Мурадов П.З., Алиев И.А., Аббасова Д.М., Аллахвердиев А.Дж., Алиева Г.А., Шахсеванимуджарад Л.А.

Институт Микробиологии НАН Азербайджана

Баку, Азербайджан

Учитывая тот факт, что для разработки получения эффективных лечебных средств необходимо всестороннее изучение физиологии грибов, имеющих медицинское значение, нами были изучены физиологические особенности питания, скорость роста и морфология ксилотрофных макромицетов - *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst (6 штаммов), *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr)Murrill (5 штаммов) и *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr)Kumm (8 штаммов). Грибы были выделены из экологически разных регионов Азербайджана.

Изучение культурально-морфологических особенностей грибов показало, что на различных средах (пшеничный агар; пшеничный агар + использованный чай, измельченный до порошка; картофельно-глюкозный агар; сусло-агар) обнаруживается различие по морфологии колоний грибов и даже аналогичные различия имели место среди штаммов одного и того же гриба. Однако каждый из штаммов имел один или несколько признаков, которые можно было обнаружить сразу на нескольких средах.

Питательные потребности штаммов оценивались по скорости роста (ростовой коэффициент - РК) на вышеуказанных плотных средах. Максимальный рост всех штаммов гриба *G.lucidum* был отмечен на агаризованном (РК=39-60) сусле, хотя штаммы гриба *L.sulphureus* наиболее активно росли на картофельно-глюкозном агаре, где средний РК варьировал от 30,2 до 53,1. Штаммы гриба *P.ostreatus* на обеих средах росли нормально, и изменение РК находилось в пределах 50-84.

Результаты, полученные при выращивании на плотных средах, позволили разделить изученные культуры грибов на две группы: быстро- и медленно-растущие штаммы. Штаммы *G. lucidum* QX-2, QX-5, *L.sulphureus* AI-5, *P.ostreatus* F-1, F-4 и F-7 относились к первой группе, т.е. они являлись быстрорастущими, для которых характерные показатели РК составляют 58-84. Диапазоны варьирования РК для остальных штаммов находились в пределах 30,2-50,3.

Проведение сравнительной характеристики скорости роста и накопления биомассы всех штаммов в глубинной культуре осуществляли на глюкозо-пептонной среде. Полученные результаты показали, что разделение штаммов на медленно- и быстрорастущие, подтверждается и в глубинной культуре. Следовательно, данные полученные либо в плотных средах, либо в глубинной культуре являются достаточными для отбора быстрорастущих штаммов.

В целях исследования пищевых потребностей штаммов всех грибов в глубинной культуре были изучены десять ферментационных сред, различающихся сочетанием источников углерода и азота. Критерием оценки пищевых потребностей гриба служило накопление биомассы.

Результаты показали, что накопление биомассы носит индивидуальный характер даже на уровне штамма. Несмотря на это, результаты показали, что для всех быстрорастущих штаммов более благоприятным является среда, имеющая такой состав (г/л): глюкоза – 10; пептон – 2,5; NH_4NO_3 – 2,0; NaCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; KH_2PO_4 , - 0,4. Культивирование штаммов, имеющих высокий скорость роста, на такой среде позволяет получить 8,2-12,5 г/л биомассы за 6 суток, что является одним из высоких показателей присущих ксилотрофным макромицетам в жидкой полусинтетической среде.

К ВОПРОСУ О ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ БАЗИДИОМИЦЕТНОГО МАКРОМИЦЕТА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* И НЕКОТОРЫХ МИКРОМИЦЕТОВ В СОВМЕСТНОЙ КУЛЬТУРЕ

Нанагюлян С.Г., Гаспарян А.А.

Ереванский государственный университет

Ереван, Армения

Известно что, плодовые тела и мицелий гриба *Schizophyllum commune* Fr. обладают лекарственными свойствами и культивируются для получения биологически активных веществ с противоопухолевыми, антимикробными, противовоспалительными и антивирусными свойствами. Однако мало известно, что гриб *Schizophyllum commune* является патогенным для человека и животных. Данный гриб может стать причиной синуситов, онихомикозов, язвенных повреждений твердого неба, бронхолегочных микозов (J.D. Rihs, A.A.Padhye, C.B. Good, 1996; T. Iizasa, K. Kamei et al., 2001 и др.).

Целью наших исследований являлось изучение взаимодействия культурального мицелия *Schizophyllum commune* и некоторых микромицетов. Были получены чистые культуры грибов *S. commune*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Alternaria alternata*, *Mucor genevensis*, *Penicillium sp.* Для изучения взаимодействия в лабораторных условиях нами использовался метод совместной культуры. Культуры грибов выращивались на картофельно– глюкозном агаре (рН 6,0) при температуре 26-28°C. Наблюдения проводились ежедневно. Повторность - трехкратная.

Результаты опытов выявили разные типы взаимодействия в совместной культуре в зависимости от комбинации, которые можно свести к следующим типам:

I - при контакте колоний *S. commune* и *A. alternata* рост микромицета останавливается, макромицет продолжает расти поверх колонии микромицета. II - при контакте колоний *S. commune* и *A. flavus* подавляется рост микромицета макромицетом (образуется зона ингибирования - $9,66 \pm 2,08$ мм), на краю колонии микромицета образуется валик. III - при контакте колоний *S. commune* и *A. niger* рост микромицета останавливается, макромицет продолжает расти поверх колонии микромицета (с задержкой роста макромицета). IV - при контакте колоний *S. commune* и *M. genevensis* рост макромицета не останавливается, микромицет продолжает расти поверх колонии макромицета. V - при контакте колоний *S. commune* и *Penicillium sp.* рост микромицета останавливается, макромицет продолжает расти поверх колонии микромицета.

Таким образом, как показали наши исследования, гриб *Schizophyllum commune* проявил максимальную анагонистическую активность в отношении гриба *Aspergillus flavus*, а при контакте *Schizophyllum commune* с колониями *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* *Penicillium sp.* рост этих грибов останавливался.

ФОТОРЕАКТИВИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Пиняскина Е.В.

Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского НЦ РАН

Махачкала

Ранее нами была показана активность длинноволнового видимого света в повышении жизнеспособности клеток при летальном действии оптического излучения ультрафиолетового и видимого (400-600 нм) диапазонов спектра. Фотовосстановление дрожжевых клеток, инактивированных этими (“экологическими”) видами оптического излучения, наблюдается при кратковременных воздействиях малых доз монохроматического света в области 400-730 нм с главным максимумом в спектре действия при 680 нм. По изученным закономерностям обнаруженный эффект принципиально отличается от отмеченных выше фотопроцессов, и это позволяет констатировать участие в его реализации нового фотоиндуцированного защитного механизма.

Для исследований использовали дрожжи *S. guilliermondii*, не имеющих системы ферментативной фотореактивации. Используя в настоящем исследовании свет длинноволнового участка видимого спектра (400-750 нм), мы выявили эффект фотовосстановления жизнеспособности клеток *S. guilliermondii*, инактивированных УФ-излучением. Максимальные уровни фотореактивации достигаются уже при кратковременных (несколько мин) воздействиях монохроматического света в малых дозах и с увеличением времени (дозы) облучения ее эффективность снижается. Отметим, что при указанных режимах облучения видимый свет не оказывал ни стимулирующего, ни тормозящего влияния на размножение дрожжевых клеток.

Полученный спектр действия обнаруживает главный максимум в красной области при 680 нм и характеризуется достаточно сложной структурой. Однако, несмотря на это, он отражает, вероятно, участие одного фоторецептора в инициации процессов, приводящих в итоге к фотовосстановлению жизнеспособности УФ-инактивированных клеток.

Установленная форма кривых принципиально отличается от дозовых кривых, известных для ферментативной фотореактивации, которые при определенных дозах ближнего УФ- и синего света достигают уровня насыщения. Важно также подчеркнуть, что фотореактивация клеток *S. guilliermondii* наблюдается при весьма малых дозах монохроматического света низкой интенсивности (0,2 Вт/м²), которые более, чем на порядок меньше доз облучения, необходимых для проявления ферментативной фотореактивации. Еще одно принципиальное отличие обнаруженной нами фотореактивации от ферментативной фотореактивации было установлено в экспериментах, где облучение УФ-инактивированных дрожжевых клеток монохроматическим светом (680 нм) проводилось при 4° С. Оказалось, что понижение температуры во время облучения абсолютно не влияет на эффективность фотореактивации (ферментативная фотореактивация в таких условиях, как известно, не наблюдается). Эти данные указывают на фотохимическую природу процесса, протекающего на начальной (световой) стадии фотореактивации клеток *S. guilliermondii*.

Выше представлены аргументы в пользу того, что этот механизм принципиально отличен от механизма ферментативной фотореактивации. В то же время он отличается и от механизма индуцируемой ближним УФ-светом фотозащиты, в основе которой лежит фотоактивированный ферментативный синтез серотонина, способного предотвращать формирование пиримидиновых димеров ДНК при УФ-облучении клеток.

Кроме того, экспериментально показано, что данная система направлена на устранение не только пиримидиновых димеров (как ферментативная фотореактивация), но и других фотоповреждений, образующихся в ДНК, в том числе путем фотосенсибилизации (например, одноцепочечные разрывы) и действие защитной системы не связано с фотоиндуцированной активацией этих репарационных систем (репликативной и пострепликативной). Рассмотренные выше данные свидетельствуют о наличии у дрожжей *S. cerevisiae* двух различных фотореактивирующих систем, направленных на увеличение выживаемости СУФ-

инактивированных клеток, - ФР680 и ферментативной фотореактивации.

СУТОЧНАЯ ДИНАМИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КАК СПОСОБ ИНДИКАЦИИ *CANDIDA ALBICANS*

Тимохина Т.Х., Николенко М.В., Варницына В.В.

Тюменская государственная медицинская академия

Тюмень

В настоящее время интенсивно развивается хронобиология, изучающая закономерности организации жизнедеятельности биологических систем во времени. Данный интерес вполне закономерен, так как биологические процессы в природе протекают с достаточно четкой периодичностью. Непрерывные циклические колебания, с одной стороны, зависят от ритмичных изменений внешних условий, таких как геомагнетизм, чередования дня и ночи, смены фаз Луны и т. д. Однако, их нельзя считать прямой реакцией на эти изменения. У живых организмов, имеются внутренние механизмы, позволяющие чувствовать течение времени и измерять его промежутки.

По нашему мнению, исследование, у грибов рода *Candida*, ритмического характера жизненных процессов, позволит, по-новому, взглянуть на биологию данного микроорганизма и процесс адаптации к условиям среды.

Цель: изучить суточную динамику пролиферативной активности грибов рода *Candida*.

Материалы и методы. В экспериментах использовались музейные (эталонные) штаммы. Вариант *Candida albicans* получен из американской коллекции типовых культур, ATCC 24433, виды *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei* идентифицированы как музейные варианты. Данные культуры обладали типичными для своего вида морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами. Для биохимической диагностики - применяли ассимиляционный колориметрический тест «Auxacolor 2» фирмы Bio-Rad. Все тест-штаммы выращивали и хранили на среде Сабуро с теллуридом. Для данной работы использовали 24 - часовую культуру. Для получения исходной концентрации грибов (1,0 единицы по Мак Фарланду), микробную взвесь стандартизировали на приборе «Densi – La – Meter» фирмы «Lachema». Исходную концентрацию титровали десятикратным шагом, доводили до рабочей концентрации, позволяющей визуально оценить и подсчитать количество изолированных колоний на поверхности агара (КОЕ/мл). Посев делали по методу Дригальского и инкубировали при температуре 37 °С в течение суток. Исследования проводились в течение 2-х суток с 4-х часовым интервалом. Было проведено 936 измерений. Результаты статистически обработаны по Стьюденту и методу наименьших квадратов.

Результаты. У всех изучаемых видов *Candida spp.* выявлена суточная динамика пролиферативной активности. В хроноинфраструктуре пролиферации всех изучаемых штаммов регистрировалась стабильность акрофазы (время максимального значения) на первые и вторые сутки исследований. У *C. albicans* значение акрофазы составили 12.00, *C. tropicalis* – 8.00-12.00 часов; *C. kefyr* и *C. krusei* – 8.00 соответственно. Данный факт позволил говорить о закономерности колебаний и явился типовым признаком временных рядов пролиферации *Candida spp.* Суточная динамика пролиферативной активности трех изучаемых видов *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* характеризовалась достоверной выраженностью циркадианного ритма (вклад ритма 49,3%, 51,1%, 51,6% соответственно, $P < 0,001$). Вклад иных колебаний незначителен. Однако, у штамма *C. albicans* преобладал ультрадианный спектр (вклад ритма 34,8%). Показатели мезора пролиферации, как стабильного параметра, у *C. albicans* находился в пределах 93,5 – 101,3 КОЕ/ мл ($P < 0,001$). Таким образом, ритмометрические показатели можно использовать для индикации *C. albicans*. Периодичность колебаний пролиферативной активности, вероятно, закреплена наследственно.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА CANDIDA ALBICANS

Тимохина Т.Х., Николенко М.В., Варницына В.В., Леонов В.В.

Тюменская государственная медицинская академия

Тюмень

Candida spp, как условно-патогенные микроорганизмы, самостоятельно не способны вызывать болезнь, их агрессивные свойства усиливаются в ассоциациях с микробами. Дрожжеподобные грибы чаще высеваются с грамположительными кокками и грамотрицательными палочками. Актуальным вопросом инфектологии и, в частности, микологии является определение «пусковых» механизмов, благодаря которым микрофлора приобретает способность к заселению различных экологических ниш и адаптации к защитно-регуляторным системам хозяина. Наиболее информативным и чувствительным методом оценки адаптивных возможностей любого живого организма признан хронобиологический метод. Исследование хронобиологических особенностей грибов рода *Candida* позволит, по – новому, взглянуть на биологию данного микроорганизма и процесс его адаптации к условиям среды. Цель – изучить суточную динамику биологических свойств *Candida albicans* (*C. albicans*) в монокультуре, а также в ассоциации с *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

Материалы и методы. В экспериментах использовали штамм *C. albicans* 24433 АТСС. Видовую принадлежность определяли по ассимиляционным колориметрическим тестам «Аухасолог 2» фирмы Bio-Rad. Биоритмы пролиферативной активности микроорганизмов изучали по оригинальной методике, разработанной авторами. Динамику пролиферативной активности определяли в течение 2-х суток с 4-х часовым интервалом. Параллельно исследовали воздействие экзосометаболитов *E. coli* 35218 АТСС, *P. aeruginosa* 27853 АТСС на суточную биохимическую активность *C. albicans*. Активность каталазы определяли фотометрическим методом, активность протеиназы классическим биуретовым методом. Контролем служили биохимические свойства грибов без воздействия метаболитов. Результаты статистически обработаны.

Результаты исследований. При оценке временных параметров у штамма *C. albicans* установлены достоверные ультрадианные (около 12 - часовые) биоритмы всех изучаемых показателей. В ранние утренние часы *C. albicans* проявляла максимальную каталазную и протеиназную активность, которые сменялись фазой максимального логарифмического роста пролиферативной активности. Экзосометаболиты грамотрицательных бактерий не изменяли профиль биологического ритма каталазной активности *C. albicans*. Ритмометрические показатели протеиназной активности грибов изменялись под влиянием метаболитов *P. aeruginosa*: смещалась акрофаза (время максимального значения) с утренних часов на вечернее время снижалась амплитуда колебаний, достоверно уменьшался мезор (среднесуточное значение показателя).

Обсуждение. Смоделированное в эксперименте влияние экзосометаболитов на *C. albicans* позволило объяснить «поведение» грибов в ассоциативной микрофлоре. Под воздействием экзосометаболитов грамотрицательной микрофлоры наблюдался дисинхроноз ферментативной активности. В большей степени воздействие на грибы оказывали экзосометаболиты *P. aeruginosa*. Возможно, изменение архитектоники ритма биологических свойств *C. albicans*, связано с продукцией *P. aeruginosa* метаболитов, участвующих в межклеточной ассоциации и тестировании плотности популяции. Анализ полученных результатов позволяет предположить существование условий, способствующих усилению размножения дрожжеподобных грибов. Вероятно, некоторые условно-патогенные бактерии изменяют биологические свойства и способствуют заселению грибами различных биотопов.

CORTICOLOUS MYXOMYCETES ON *SAMANEA SAMAN* (JACQ.) MERR: RECORDS OF RARE MYXOMYCETE SPECIES FROM THE PHILIPPINES

Heherson N., Dagamac A.^{1, 2}, Leontyev D.V.³, dela Cruz T.E.^{1, 2}

¹ – Университет Св. Фомы

² – Исследовательский центр естественных наук

³ – Кафедра ботаники Национального фармацевтического университета
Манила, Филиппины – Харьков, Украина

The Philippines, an archipelago of 7,107 islands, has a total land area of 300,000 km². Situated 800 km from the mainland Asia, the country has a tropical climate characterized by an alternation of rainy and dry seasons. Its mean annual temperature and rainfall ranges from 18-27 °C and 965-4,064 mm, respectively. This ideal climatic conditions in the country resulted to extensive areas of montane, limestone and coastal forests. These habitats harbor the great number of species, many of which are endemics. Thus, the Philippines are considered as a megahotspot of biodiversity. However, some groups of organisms were left insufficiently explored in the Philippines. One of these less-studied organisms are those belonging to the class Myxomycetes – fungi-like protists, closely related to lobose amoeboids but able to form macroscopic fruiting bodies. To study the diversity of corticolous myxomycetes in the region, dead bark samples from living trees of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. were collected from different sites within the Luzon Island during the months of March to November 2008. The collected bark samples were then placed in moist chamber set-ups for eight weeks. Three species, collected from them, were found to be new records for the Philippines. Here we present their descriptions, localities and some geographical notes.

Clastoderma microcarpum (Meyl.) Kowalski, Mycologia 67 (3):475 (1975). Location: Diliman, Quezon City (28.July.08) on the bark of *S. saman*. The species is known so far from Europe (Switzerland) and Japan, so our record is the first for Philippines.

Sporocarp stalked, 0.5 mm tall. Stalk 0.4 mm long, almost black, stuffed with refuse matter, conical, 160 μm wide in the base and narrowing to 13 μm diam. at the apex. The upper part of the stalk translucent reddish brown, free from refuse matter. Sporotheca polygonal to globose, 0.25 mm diam., dark brown. Columella rise to 2-4 main capillitium branches. Capillitium rigid, sparsely branching, anastomosed at the periphery to form a lax surface net with underdeveloped, small membranous expansions. Spores rusty-brown in mass, pale violet-brown in transmitted light, 13.5-15 μm diam., verruculose.

Dianema cf. *harveyi* Rex, Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 43:397 (1891). Location: Diliman, Quezon City (28.July.08) on the bark of *S. saman*. The species is known from Northern America, Europe, Central Asia, Japan and New Zealand. Our record is the first for Philippines.

Sporocarps sessile, in small groups. Hypothallus inconspicuous. Sporothecae pulvinate, round or elliptic from above, 0.5 mm diam., olive-yellowish (!), iridescent. Peridium membranous, thin, translucent, almost colourless in transmitted light. Dehiscence irregular. Capillitial threads filiform, stiff, somewhat sinuous, rarely dichotomously branched. Spores in mass yellowish, pale yellow-brown in transmitted light, (8-)10 μm diam., thin-walled, verruculose.

Diderma subasteroides M.L.Farr, Mycologia 63(3):637 (1971). Location: Subic Bay, Olongapo City, Zambales (24 March 08) and Alaminos City, Pangasinan (15.May.08) on dead bark of *S. saman*. The species is known so far from Argentina and Central Africa, so our record is new for the Philippines and for the Asia-Pacific Region.

Sporocarps in groups, stipitate, 1-2 mm in total height. Sporothecae hemispherical to subdiscoid, white with brown collar at the base, 0.5-1 mm diam. Hypothallus membranous, pale brown, discoid. Stalk c. 1/3 of the total height, rugose, brown, translucent, merging into the sporotheca base, forming thin radiating pleats. Peridium triple, the outer layer brown, usually covering only basal part of sporotheca, forming the ‘collar’. The middle layer is white, calcareous, consists of lime granules. The inner layer membranous and inconspicuous. Capillitium threads attached to peridium and columella, branched and anastomosed, pallid under the lens, brown in transmitted light. Spores dark brown in mass, dark brown in transmitted light, 12-13 μm diam., densely warted.