

Новые антимикотики и перспективные фунгициды

Novel and perspective antifungals

ВРОЖДЕННАЯ ЗАЩИТА КЕРАТИНОЦИТОВ ВОЛОС ОБУСЛОВЛЕНА АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ

Арзуманян В. Г., Вартанова Н. О., Сердюк О. А., Ожован И. М.

НИИ Вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН, Москва

Институт диагностики и профилактики социально значимых заболеваний, Москва

Одним из важных факторов врожденного местного иммунитета являются антимикробные пептиды (АМП) – семейство из более, чем 500 соединений, защищающих различные эпителиальные ткани [Bals et al, 2000; Zasloff M., 2002]. Недавно мы подробно освещали вопросы, связанные со структурой и функцией АМП, которые выделяются на поверхности кожи [Арзуманян В. Г., Кабаева Т. И., 2008]. Однако в литературе отсутствуют данные о наличии химической защиты придатков кожи – волос и ногтей. В то же время известно, что придатки кожи могут поражаться многими микроорганизмами, обладающими кератинозной активностью, в том числе, грибами и бактериями. Целью настоящей работы явилось исследование наличия и активности АМП в клетках здоровых волос.

Образцы волос получали от 5 женщин в возрасте от 7 до 50 лет, не пользующихся химической окраской и завивкой. Образцы измельчали ножницами, затем растирали в ступке с пестиком до полной гомогенности, добавляя 0,1 М лимонную кислоту в 50% водном этиловом спирте [Harder, 2001]. Полученный бесклеточный гомогенат центрифугировали, супернатант сушили при 27°C. Сухой экстракт смывали калийфосфатным буфером (КР) рН 8, 2 и снова центрифугировали; конечный рН раствора 6, 5 (далее обозначаем как раствор Э). Контролем к раствору Э явился исходный раствор лимонной кислоты, обработанный по той же схеме (К).

Тест-культурой явился штамм *Candida albicans* № 927 из коллекции НИИ Вакцин и сывороток имени Мечникова РАМН, выращенный на глюкозо-пептон-дрожжевой среде (ГПД) в течение 2 суток при 27°C. Для исследования антимикробной активности использовали 3 метода – определение жизнеспособных клеток методом микроскопирования и посевов, а также определение зоны ингибирования роста.

Для микроскопирования тест-культуру разводили в КР рН 4, 6 и аликвоту этой суспензии соединяли с аликвотой раствора Э. После инкубации в течение 2 часов при 32°C к смеси добавляли раствор бромкрезолового пурпурного [Kurzweilova H, Sigler K., 1993], инкубировали 1 час при 32°C, клетки отделяли центрифугированием, микроскопировали при увеличении $\times 1750$ и фотографировали камерой Sony DSC-W7. Микроскопирование показало, что после обработки контрольным раствором практически все клетки остались живы, в то время как в опытном образце, обработанном раствором Э, живых клеток почти нет. Большая часть клеток была убита, причем наблюдалась не просто деструкция мембран, характерная для действия АМП [Арзуманян В. Г., Кабаева Т. И., 2008], но даже разрушение клеточных стенок, что не дало возможности подсчитать процент убитых клеток.

Для определения антимикробной активности методом посевов аликвоту суспензии дрожжей (конечная концентрация клеток примерно 10^3 КОЕ/мл) соединяли с аликвотой раствора Э, перемешивали и отсеивали по 20 мкл смеси сразу и по прошествии определенного времени на чашки Петри, содержащие среду ГПД. Чашки инкубировали 2 суток при 27°C, после чего подсчитывали число выросших колоний. Установлено, что в течение полутора часа популяция теряла до 28% клеток, 1 часа – до 40% клеток, а 3 часов – до 52% клеток. При этом клетки, обработанные контрольным раствором, полностью сохраняли жизнеспособность.

Определение зоны ингибирования роста проводили следующим образом: в теплую расплавленную среду ГПД засеивали тест-культуру из расчета примерно 50 КОЕ/мл, разливали в чашки Петри и давали застыть и подсохнуть. Затем по центру чашек наносили по 20 мкл раствора Э и контрольного раствора. Чашки инкубировали при комнатной температуре 4 суток, затем фотографировали. Показано наличие зоны просветления диаметром около 15 мм в опытных вариантах при отсутствии таковой в контрольном варианте.

Таким образом, тремя различными способами доказано наличие антимикробной активности в экстрактах волос. Поскольку метод экстракции предполагает извлечение пептидов, было бы логично ожидать взаимосвязь между их наличием и антимикробной активностью. Удаление пептидов из экстракта с помощью мембранного фильтра с размером пор, соответствующим 3 кДа, приводило к потере противокандидозной активности в по-

лученном фильтрате. Разделение экстракта волос в градиенте 5-20% полиакриламидного геля проводили по методу [Lambin P. et al., 1976], окрашивали гель с помощью нитрата серебра. Оказалось, что экстракт действительно содержит низкомолекулярные белки. Наиболее отчетливая полоса соответствует молекулярной массе примерно 14,4 кДа. Судя по данному показателю это скорее всего РНКазы – антимикробный пептид, конститутивно экспрессированный в кератиноцитах кожи [Harder, J. Schroeder J., 2002]. Вторая по интенсивности полоса соответствует молекулярной массе около 23 кДа, однако среди известных АМП кожи нет пептидов с таким весом. Множественные полосы имеются в диапазоне от 12 до 3 кДа, что может соответствовать псориазину (11,4 кДа) [Glaser R. Et al, 2004] и в-дефензинам (3,5-4,5 кДа) [Bals R, 2000].

На основании полученных результатов можно утверждать следующее: а) экстракты здоровых волос обладают противомикробным действием, вызывающим лизис клеточных мембран микроорганизмов; б) противомикробное действие экстрактов волос обусловлено наличием внутриклеточных антимикробных пептидов; в) кератиноциты волос, как и кератиноциты кожи, содержат эндогенные пептиды, которые играют важную роль во врожденной защите волос от кератинофильных микроорганизмов.

ВОЗМОЖНОСТИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ИНГИБИРОВАНИИ РОСТА ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*

Баженов Л. Г., Садыков Р. А., Миришова Ш. И., Баженова С. С.

**Республиканский специализированный центр хирургии имени В. Вахидова, Ташкент
Ташкентская медицинская академия**

Фотодинамическая терапия (ФДТ) в последнее время привлекает пристальное внимание исследователей различного профиля вследствие ее высокой эффективности. При этом особенное место занимает антимикробная ФДТ, характеризующаяся широким спектром антимикробного действия и в отличие от антибиотиков практически полным отсутствием побочных эффектов и неспособностью микроорганизмов вырабатывать резистентность к данному фактору.

Задачей настоящего исследования явилось изучение активности антимикробной ФДТ в отношении клинических штаммов грибов рода *Candida*. Исследовано 10 штаммов *C. albicans*, выделенных из различных видов патологического материала. В качестве фотосенсибилизатора использовали растворы метиленового синего (МС) в концентрациях 0,01% и 0,05%, источником светового (красного) излучения служила установка ФДУ-1 с излучением в спектральном диапазоне 600-660 нм, мощностью 5 Вт и плотностью мощности – 250-500 мВт/см². Исследование выполняли следующим образом: на чашку со средой Сабуро засеивали газон суточную тест-культуру *C. albicans*, на поверхность газона помещали каплю раствора МС, после 10 минутной экспозиции, зону контакта микроорганизмов и МС облучали красным светом (1, 5 и 10 мин). Затем посеы помещали в термостат при 37° С на 18-24 часа. Учет результатов выполняли путем измерения зоны ингибиции роста тест-штамма.

Установлено, что растворы МС 0,01% и 0,05% в отсутствии светового облучения не оказывали ингибирующего действия на испытанные культуры *C. albicans*. Эти же растворы при воздействии красного света проявляли антимикробный эффект, выраженность которого зависела как от концентрации МС, так и от продолжительности светового воздействия. Наибольшие зоны ингибиции микробного роста (11-12 мм в диаметре) наблюдались при концентрации МС 0,05% и 10-ти минутном световом облучении.

Таким образом, ФДТ с использованием в качестве фотосенсибилизатора МС и светового излучения в диапазоне 600-660 нм обладает выраженным антикандидозным действием, что может быть использовано при лечении различных патологических процессов, обусловленных грибами рода *Candida*.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИФУНГАЛЬНЫХ СВОЙСТВ *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* НА СРЕДЕ С ХИТИНОМ

Бурова Ю. А., Нешина М. А., Ибрагимова С. А.

Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарева, Саранск

Возбудителями различных болезней сельскохозяйственных культур чаще всего являются фитопатогенные грибы. Продуцируя различные ферменты, они разрушают клеточную оболочку растений, вызывая различные патологии роста и развития, поражая вегетативные и генеративные органы, паразитируют на семенах, ростках и на созревающих растениях. К возбудителям фитозаболеваний относятся грибы родов *Fusarium*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Verticillium*, *Erysiphales* и другие. *Botrytis cinerea* является широко распространенным паразитом - некротрофом, поражая многие культурные и дикорастущие растения разных групп, вызывает опасную болезнь – серую гниль. *Phytophthora infestans* — возбудитель фитофтороза картофеля и томата, одной из самой вредоносной болезни этих культур во всем мире. При фузариозе поражаются сосудистая система и ткани растений, при этом их поражения и гибель происходят из-за резкого нарушения жизненных функций вследствие закупорки сосудов мицелием гриба и выделения им токсических веществ.

Все чаще для защиты растений применяют биологические методы борьбы с фитопатогенами.

Нами были получены положительные результаты антогонистического воздействия культуральной жидкости нового штамма бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на развитие *Fusarium culmorum*.

Основным компонентом клеточной стенки грибных гиф является хитин, разрушение которого возможно под действием бактериальных хитиназ.

Целью данной работы явилось исследование влияния хитинсодержащего сырья как дополнительного источника питания на рост и микопаразитические свойства бактерий. Культивирование *Pseudomonas aureofaciens* проводили на жидкой фракции послеспиртовой барды (контроль). В опытный вариант добавляли хитин ракообразных. Показано положительное влияние хитина на уровень микробных клеток. При культивировании *Fusarium culmorum* на поверхности картофельного агара отмечена низкая скорость роста гриба в присутствии бактериальной суспензии. Причем степень микопаразитического воздействия псевдоманад на развитие фитопатогена в обоих вариантах не имела существенного отличия. Мицелий был представлен слаборазветвленными гифами, стелящимися по поверхности агара.

По истечении 50 суток хранения культуральной жидкости бактерий было проведено повторное исследование. Результаты показали сохранение высокого титра активных клеток псевдоманад и усиление их антогонистических свойств.

Полученные данные свидетельствуют о возможном использовании хитинсодержащего сырья как дополнительного источника питания, способствующего продлению сроков хранения биопрепаратов с сохранением их антифунгальной активности.

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ МИКРОМИЦЕТОВ В МАГНИТОСТАТИЧЕСКИХ ПОЛЯХ НА СРЕДАХ С ДОБАВЛЕНИЕМ СОЛЕЙ МЕДИ И ЦИНКА

Быстрова Е. Ю., Панина Л. К.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Ранее нами изучена вариабельность ряда морфофизиологических свойств у двух видов мицелиальных грибов *Ulocladium consortiale* и *Neurospora crassa* при экспонировании в постоянном магнитном поле, превышающем магнитное поле Земли (МПЗ), а также в условиях гипогеомагнитного поля [1]. Установлено, что постоянное магнитное поле, превышающее МПЗ, главным образом, воздействует на скорость роста культуры, в то время как экранированное МПЗ оказывает влияние на процессы спороношения, морфологию клеток, а также снижает ферментативную (фосфолипазную) активность у видов *U. consortiale* и *N. crassa*.

В настоящей работе исследованы эффекты одновременного воздействия магнитостатических полей и дополнительно введенных в питательную среду солей металлов (CuSO_4 , ZnSO_4) на развитие колоний *U. consortiale*. Постоянное однородное магнитное поле с индукцией 8 мТл задавалось между полюсами наконечников постоянного магнита. Для создания гипогеомагнитного поля (2 мкТл) использовалась экранирующая камера, изготовленная из сплава аморфного магнитомягкого материала АМАГ172. Контролем являлись колонии, формирующиеся на средах с добавлением солей меди и цинка в условиях фонового геомагнитного поля. Установлено, что при культивировании микромицетов на оптимальных питательных средах с добавлением CuSO_4 в низких концентрациях (40 и 80 мг/л) действие постоянного магнитного поля, превышающего МПЗ, также как и экранированного МПЗ не приводит к существенным изменениям радиальной скорости роста колоний по сравнению с контрольными значениями ($p > 0,05$). Увеличение концентрации CuSO_4 до 800 мг/л оказывало стимулирующий эффект: скорость роста колоний как в магнитном, так и в гипогеомагнитном поле возрастала на 42 % и 31 %, соответственно ($p < 0,05$). В случае развития грибов на минимальном голодном агаре с добавлением CuSO_4 в высоких концентрациях (800 мг/л) наблюдалось ингибирование роста. При этом радиальная скорость роста культуры в магнитном поле, превышающем МПЗ, снижалась на 35 %, а в условиях экранированного МПЗ на 17 % относительно контроля ($p < 0,05$). Установлено также, что ингибирующее воздействие магнитостатических полей усиливается при дополнительном введении в питательные среды солей цинка (например, ZnSO_4 в концентрации 800 мг/л). Данный режим оказался весьма эффективным для подавления роста колоний при культивировании как на оптимальных, так и на бедных средах. Показано, что в случае развития микромицетов на оптимальных средах с добавлением ZnSO_4 (800 мг/л) радиальная скорость роста культуры снижается на 38 % в постоянном магнитном поле, превышающем МПЗ, и на 25 % в условиях гипогеомагнитного поля ($p < 0,05$). Колонии *U. consortiale*, формирующиеся на субстратах с добавлением солей Cu^{2+} , Zn^{2+} в высоких концентрациях, характеризуются небольшим или значительным временным запаздыванием фазы спороношения, а также частичным или практически полным ингибированием процессов образования конидий в зависимости от типа питательной среды. Наблюдаемые эффекты усиливаются при экспонировании колоний в магнитостатических полях.

Таким образом, применение магнитных методов может увеличивать эффективность действия других неблагоприятных для развития микромицетов факторов. Полученные результаты обладают возможностью практического применения в связи с проблемами биоповреждений и биоустойчивости материалов.

ТАКРОЛИМУС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ДРОЖЖИ

Голубев В. И.

Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пущино

Макролидный антибиотик, такролимус (FK506), используется в хирургии как иммуносупрессор, подавляющий формирование лимфоцитов, ответственных за отторжение трансплантатов. С биохимической точки зрения действия его обусловлено образованием комплекса с пролин-изомеразой, который связывает кальций-зависимую фосфатазу (кальциневрин), ингибируя тем самым сигнальные каскады, необходимые для активации многих клеточных процессов. Растущая потребность в иммуносупрессорах вынуждает интенсифицировать поиск новых активных продуцентов, а также удобных способов определения макролидов в ходе выделения и очистки. Эти задачи могут быть удовлетворительно решены микробиологическими методами при наличии высоко чувствительных тест-культур. В целях обнаружения последних нами были обследованы полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru>) 34 штамма 24 видов дрожжевых грибов, принадлежащих к 22 родам. В качестве источника такролимуса служил его продуцент - штамм *Streptomyces sp.* Тестирование осуществляли на глюкозо-пептонном агаре с инкубацией при 20° и 37°С. Чувствительные к такролимусу виды обнаружены в родах *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Saccharomyces* и *Tsuchiyaea*. Как наличие, так и степень чувствительности к такролимусу зависят не только от таксономической принадлежности дрожжей, но и от штамма. В частности, среди девяти штаммов *Sacch. cerevisiae* чувствительными оказались лишь два, причем один из них – слабо. Также два штамма *F. neoformans* сильно различались между собой по чувствительности к такролимусу. Штамм типа спаривания а был к нему слабо чувствителен в противоположность штамму типа спаривания б. Судя по ширине зон подавления роста вокруг колоний *Streptomyces sp.*, наибольшей чувствительностью характеризуется *Ts. wingfieldii*. Следует отметить, что последний вид, а также чувствительный к такролимусу *Cr. amyloletus*, филогенетически очень близки *F. neoformans*, образуя монофилетичный кластер *Filobasidiella sensu stricto*.

ВЛИЯНИЕ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ НА АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БИФИДОБАКТЕРИЙ

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

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург

При взаимодействии микроорганизмов в условиях биоценоза может происходить модификация биологических свойств симбионтов (Бухарин О. В., 2006, 2007; Перунова Н. Б., 2003) в том числе изменение их антагонистической активности (АА). При данном варианте взаимоотношений активный штамм играет роль продуцента антимикробных веществ, а ассоциативные бактерии - определяют возможность и выраженность проявления свойства (Holden et al., 1996; Cha et al., 1998; Pierson et al., 1998). Известно, что в реализации антагонистического типа отношений между микроорганизмами могут участвовать различные микробные регуляторы – феромоны, гомосеринлактоны и клеточные стенки, как было показано на примере условно-патогенных бактерий (Yan L., 2003). Однако вопрос о возможности модификации антагонистических свойств нормофлоры, а именно бифидобактерий, в присутствии регуляторных компонентов дрожжевых грибов, остаётся открытым.

Целью работы явилось изучение влияния клеточных экстрактов и экзометаболических продуктов грибов рода *Candida* и *Rhodotorula* на антагонистическую активность различных видов бифидобактерий.

Материалом для исследования послужили 76 штаммов бифидобактерий (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*), доминирующих в кишечном биоценозе человека и 20 культур дрожжевых грибов (*Candida albicans* и *Rhodotorula rubra*). Бифидобактерии культивировали на агаре Shadler с использованием анаэробных пакетов (BBL, США) и газогенераторных пакетов (GasPack plus, BBL, США). Антагонистическую активность определяли модифицированным методом отсроченного антагонизма по Murgiana P. (1987). С целью получения экзометаболических продуктов, 48 часовые бульонные культуры грибов откручивали при 3000 об/мин 15 минут и пропускали через мембранные фильтры с диаметром пор 0, 2 мкм. Клеточные экстракты дрожжевых грибов выделяли путем обработки смыва агаровой культуры смесью хлороформа и этилового спирта.

Результаты: установлено, что все изоляты бифидобактерий, используемые в эксперименте, не проявляли антагонистической активности в отношении исследуемых культур грибов рода *Candida* и *Rhodotorula*. Однако предварительное сокультивирование штаммов бифидобактерий с экзометаболическими и клеточными экстрактами дрожжевых грибов впоследствии приводило к стимуляции антагонистической активности *Bifidobacterium spp.* в отношении грибовых патогенов.

Культуры *Candida albicans* активировали антагонизм *B. bifidum* против себя в 18% случаев посредством клеточных экстрактов и в 27% - за счет экзометаболических. Было отмечено появление АА в 61% и 29% случаев у штаммов *B. longum* после предварительной обработки КЭ грибов рода *Candida* и *Rhodotorula* соответственно. Экзометаболические продукты *Candida albicans* были способны стимулировать АА у *B. longum* в 60% случаев. Клеточные экстракты грибов рода *Candida* и *Rhodotorula* стимулировали антагонизм *B. adolescentis* против себя в 27-30% случаев, а экзометаболические – в 51-59% случаев.

Заключение: выявлено, что экзометаболиты и клеточные экстракты дрожжевых грибов модулируют антагонистическую активность бифидобактерий. В большинстве случаев отмечено, что грибы рода *Candida* и *Rhodotorula* способны активировать АА *Bifidobacterium* spp. против себя. Дальнейшее изучение этих вопросов открывает перспективы выявления новых механизмов формирования и функционирования микробиоценозов при ассоциативном симбиозе, направленных на реализацию колонизационной резистентности, через регуляцию антагонизма индигенных микроорганизмов ассоциативными микросимбионтами. Полученные сведения можно применить при создании синбиотиков пригодных для борьбы с грибковыми патогенами.

ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Калмыкова Г. В.¹, Кузнецова Т. Т.¹, Чекрыга Г. П.¹, Бурцева Л. И.²

¹ Сибирский НИПТИ переработки сельскохозяйственной продукции СО Россельхозакадемии

² Институт Систематики и Экологии Животных СО РАН

Бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) широко известны как продуценты эффективных экологически безопасных биоинсектицидов благодаря действию высокоспецифичных дельта-эндотоксинов, синтезируемых во время споруляции.

Однако в последнее годы было выявлено, что метаболиты *Bt* способны контролировать болезни растений, вызванные патогенными грибами. Было установлено, что антибиотик цвитермицин А с широким спектром действия, продуцируемый *Bt*, был эффективен против *Phytophthora medicaginis*, которая вызывает болезни люцерны [Stabb E. V. et al., 1994], хитиназа *Bt* ssp. *aizawai* ингибировала мицелиальный рост грибов рода *Fusarium* и *Sclerotium rolfsii* [De la Vega L. M., 2006], метаболиты *Bt* ssp. *kurstaki* ограничивали рост *Aspergillus niger*, который вызывал черную гниль лука и арахиса [Driss F., 2005] Нами было выявлено, что штамм 221 *Bt* ssp. *thuringiensis* угнетал рост грибов рода *Mucor* и *Fusarium* [Г. В. Калмыкова и др., 2009].

В коллекции лаборатории патологии насекомых Института Систематики и Экологии Животных СО РАН хранятся штаммы *Bt*, относящиеся к 43 подвидам, которые охарактеризованы по ряду свойств. Для оценки фунгицидной активности штаммов *Bt* были выбраны 11 штаммов различных подвидов, которые проявляли литическую активность в отношении *Micrococcus lysodeikticus*. В качестве тест-микроорганизма использовали штамм *Alternaria alternata*. Для определения фунгицидной активности применяли метод двойных культур.

Тестирование фунгицидной активности штаммов *Bt* данным методом показало, что все штаммы давали четко выраженную границу между бактериальной и грибной культурами. На седьмые сутки зона подавления роста *A. alternata* варьировала от 15 до 30 мм, в зависимости от бактериального штамма; через неделю (на 15 сутки) зона подавления уменьшилась для всех штаммов за счет роста микроскопического гриба. Наибольшая зона ингибирования роста гриба (до 20 мм на 15 сутки) отмечалась для двух штаммов *Bt* ssp. *entomocidus*. Микроскопия *A. alternata* после совместного культивирования с этими штаммами выявила снижение спорообразования и слабое развитие мицелия. Хотя микроскопический гриб на 15 сутки развивался в непосредственной близости к штамму 5m *Bt* ssp. *kurstaki*, он не распространялся на бактериальный рост. Микроскопическое исследование показало, что в данном случае происходили изменения в гифах мицелия: наблюдалась грануляция цитоплазмы, образование хламидоспор, большее ветвление гиф мицелия и выход их содержимого, отмечалось снижение тонуса гиф. Аналогичная картина наблюдалась при совместном культивировании *A. alternata* со штаммом *Bt* ssp. *shandongiensis*, но, кроме того, мы отмечали образование на концах конидий пузыревидных вздутий. Действие штамма 221 *Bt* ssp. *thuringiensis* на рост *A. alternata* проявлялось в образовании нетипичных мелких без перегородок спор, которые были слабо пигментированы и характеризовались активным прорастанием спор. Действие штаммов *Bt* ssp. *morrisoni*, *yunanensis*, *colmeri*, *shandongiensis*, *neoleonensis*, *mexicanensis*, *amagiensis* было менее выраженным и отмечалось в образовании хламидоспор, инкрустации спор за счет повышенного содержания меланина.

Полученные результаты показали, что все выбранные нами штаммы *Bt* проявляют антагонистические свойства в отношении *A. alternata*. Различия действия штаммов *Bt*, возможно, связаны с разнообразием антимикробных веществ, продуцируемых этими штаммами.

АНТИГРИБКОВОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ДУШИЦЫ И МЯТЫ.

Качан А. В., Новиков Д. А.

РНПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству, Самохваловичи БГУ, Минск

Антимикробное действие эфирных масел распространяется практически на все группы микроорганизмов: грамположительные и грамотрицательные кокки, вибрионы, многие виды грибов, простейшие, вирусы.

Были использованы две культуры гриба *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*. Также были использованы 2 эфирных масла коммерческого происхождения фирмы «Биаск» (мяты перечной *Mentha piperita*, душицы обыкновенной).

венной *Origanum vulgare*). Культуру грибов выращивали в жидкой среде Чапека. Среда Чапека (г/л): сахароза – 30, NaNO_3 – 2, KH_2PO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, KCl – 0,5, FeSO_4 – 0,01. Среда Чапека разогревается на водяной бане до полного растворения (30 минут). Охлаждается до 37. °C – 40°C, вносится в пробирки по 4 мл. В пробирки вносится также эфирное масло мяты перечной и душицы обыкновенной в количестве 20 мкл, 50 мкл, 100 мкл, 200 мкл, 300 мкл, 400 мкл, 500 мкл. После 4 суток мицелий гриба отделяется от культуральной жидкости путем фильтрования, высушивается и взвешивается на весах.

Изменение роста *A. niger* на среде Чапека через четверо суток после обработки эфирным маслом мяты перечной (г). Была установлена определенная зависимость: при увеличении количества добавляемого эфирного масла мяты перечной рост гриба замедляется. Наиболее эффективно эфирное масло мяты подействовало в количестве 500 мкл (масса гриба уменьшилась на 30% по отношению к контролю).

Изменение роста *P. glaucum* на среде Чапека через четверо суток после обработки эфирным маслом мяты перечной (г). Наблюдается определенная зависимость: при увеличении количества добавляемого эфирного масла мяты перечной рост гриба *P. glaucum* замедляется. Наиболее эффективно эфирное масло мяты подействовало в количестве 400 (масса гриба уменьшилась на 21, 7%) и 500 мкл (масса гриба уменьшилась на 50%).

Изменение роста *A. niger* на среде Чапека через четверо суток после обработки эфирным маслом душицы обыкновенной (г). Установлена определенная зависимость: при увеличении количества добавляемого эфирного масла рост гриба *P. glaucum* замедляется. Наиболее эффективно эфирное масло душицы подействовало в количестве 400 (масса гриба уменьшилась на 87%) и 500 мкл (масса гриба уменьшилась на 90%).

Изменение роста *P. glaucum* на среде Чапека через четверо суток после обработки эфирным маслом душицы обыкновенной (См). Экспериментально определено, что в количестве 300 и 400 мкл эфирного масла душицы масса гриба уменьшилась на 41, 7%, а при добавлении 500 мкл масса гриба уменьшилась на 58, 4%.

Эфирное масло душицы обыкновенной проявляет более сильные антигрибковые свойства по сравнению с эфирным маслом мяты перечной. Это объясняется тем, что для летучих фракций эфирных масел антимикробная и антигрибковая активность нарастает в следующей последовательности входящих в них компонентов: углеводороды, окиси, фенолы, альдегиды, кетоны, спирты, сложные эфиры. А эфирное масло душицы содержит до 68% карвакрола (производного фенола). Защитная роль эфирных масел заключается не только в способности убивать микробов. Они могут находиться в комплексных соединениях с белками и другими питательными веществами растительных клеток и тем самым делать их неусвояемыми для микробов.

ИСПЫТАНИЕ ЭФЕКТИВНОСТИ НОВОГО СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА ПОТИВ МИКРОСПОРИИ СОБАК

Колесник Н. И.

Государственный НКИ биотехнологии и штаммов микроорганизмов, Киев

Дерматомикозы - распространенная группа заболеваний как людей, так и домашних животных. Профилактика этого заболевания у собак и кошек, к сожалению, в большинстве случаев проводится несвоевременно. В связи с этим терапевтические препараты специфического действия, например, синтетические антибиотики на основе тербинафина и клотримазола на сегодняшний день являются актуальными.

В другую группу лечебных средств, издавна используемых в гуманной и ветеринарной медицине при заболеваниях кожи можно отнести препараты серебра. Для них характерный широкий спектр биоцидного действия, в том числе по отношению к вирусам, бактериям, грибам. Препараты серебра не вызывают у патогенов резистентность и не имеют кумулятивных свойств. Эффективность серебра, согласно литературных данных, усиливается в случае использования его в форме наночастиц (10-20 нм). В биологических жидкостях структурированное серебро, в отличие от ионного, растворяется медленно, не создает сильного припекающего и подсушивающего действия. Препарат длительное время может сохранять агрегативную стойкость в растворах электролитов.

В ГНКИБШМ в 2009 г проводили клиническое исследование нового отечественного препарата для лечения дерматомикозов - аргодерм в форме наночастиц серебра в матрице альгината натрия из полисахаридов бурых морских водорослей (патент Украины № 10539), разработанного коллективом ученых из Таврического национального университета и института биологии южных морей НАНУ.

Цель нашей работы заключалась в определении лечебного действия препарата аргодерм по сравнению с известными антифунгальными препаратами местного действия: ламикон (д. в. - тербинафин), санодерм, противогрибковая эмульсия ДК (д. в. - клотримазол) против микроспории при искусственном заражении собак.

Для кожного заражения опытных животных использовали 14-ти суточные культуры *Microsporum canis* из коллекции ГНКИБШМ. Инокулюм в дозе 0,5 см³ с концентрацией 2,5 млн. микроконидий наносили на предварительно выстриженную, после чего побритую область кожи размером 4 x 4 см. В опыте использовали 5 групп по 6 собак массой (1,5 - 2 кг), возрастом 3 - 5 месяцев, которые ранее не подвергались иммунизации.

Наблюдение за животными вели начиная со второго дня с момента инокуляции. Лечение начинали с момента установления диагноза на микроспорию: по результатам микроскопии проб волос, соскобов чешуек с места инокуляции, а также высеваания их на агар Сабуро. Препараты наносили дважды в день на пораженный участок и здоровую кожу вокруг него шириной около 1 см. Препараты наносили до момента возобновления роста волос. Доказательством выздоровления животных было отсутствие клинических признаков болезни и негативные результаты микологических исследований.

В результате лечения все опытные животные выздоровили приблизительно одновременно: для полного возобновления волосяного покрова потребовалось 24-25 дней от инокуляции при лечении аргодермом, санодермом и эмульсией ДК, ламикона - 32 ± 6 дней. Контрольные животные (без лечения) выздоравливали значительно позже - на 56-58 день.

Таким образом, лечение микроспории собак серебросодержащим препаратом аргодерм показало, что его лечебный эффект был на уровне санодерма и противогрибковой эмульсией ДК. В связи с чем его можно рекомендовать к промышленному производству и внедрению в ветеринарную практику.

ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОПРОДУКТОВ ЧАЙНОГО ГРИБА НА НЕКОТОРЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Лесовой В. С., Гришина М. А., Липницкий А. В.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград

Предлагаемые в настоящее время противогрибковые препараты являются, в основном, продуктами химического синтеза. Однако они дорогостоящие и обладают рядом побочных действий. Наилучшая тактика лечения микозов – это сочетание современных антифунгальных препаратов с препаратами природного происхождения, полученными, в частности, из растений.

Большим набором биологически активных веществ, обладающих пребиотическими и пробиотическими свойствами, является, так называемый, «чайный гриб» или «Kombucha Tea». Он представляет собой симбиоз уксуснокислых бактерий *Acetobacter* (чаще всего *A. xylinum*) и разных видов дрожжевых грибов родов *Brettanomyces* (56%), *Zygosaccharomyces* (29%) и *Saccharomyces* (26%). В единичных случаях дрожжи представлены *Saccharomyces ludwigii* и *Candida kefyr*.

Мы изучили действие концентрата культуральной жидкости чайного гриба на пекарские дрожжи, возбудителей кандидоза, геотрихоза, криптококкоза, бластомикоза, на мицелиальные условно-патогенные грибы, принадлежащие к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotris*, *Trichoderma*, а также на устойчивые к антибактериальным антибиотикам штаммы *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Для получения культуральной жидкости чайного гриба его выращивали на кипяченой и охлажденной до комнатной температуры воде, содержащей крепкий настой черного цейлонского чая и 10% сахарозы, в течение 4-5 сут. Отделенную от мицелиальной массы культуральную жидкость концентрировали до 25% первоначального объема с помощью полиэтиленгликоля с молекулярной массой 40000. Этот концентрат использовали во всех экспериментах.

Для этого культуры дрожжеподобных и мицелиальных грибов, приготовленные в виде взвеси в 0,9% растворе хлорида натрия, засеивали сплошным газоном в чашки с агаром Сабуро. В агаре металлическим пробойником диаметром 6 мм делали лунки, которые заполняли концентратом чайного гриба. Посевы инкубировали при 28°C. Через 3, 5, 7 и 10 сут посевы просматривали, учитывая наличие или отсутствие роста вокруг лунок, интенсивность роста и спорообразования у мицелиальных грибов, а также пигментообразования у окрашенных грибов. В контрольных посевах в лунки вносили 0,9% раствор хлорида натрия. Полученные результаты показали, что концентрат чайного гриба оказывал в течение 3 сут фунгистатическое действие на *C. albicans*, что проявлялось в виде зон отсутствия роста шириной 5 мм; в более поздние сроки вокруг лунок появлялись единичные мелкие колонии возбудителя кандидоза. На другие дрожжеподобные грибы концентрат чайного гриба не оказал никакого влияния.

На мицелиальные грибы, взятые для постановки экспериментов, концентрат культуральной жидкости чайного гриба оказывал кратковременное (до 3-4 сут) фунгистатическое действие. Позднее эти грибы росли так же, как и в контроле.

Наиболее чувствительными к концентрату чайного гриба оказались *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Вокруг лунок со внесенным препаратом имелись стерильные зоны шириной от 20 до 30 мм, которые сохранялись до конца эксперимента, что открывает перспективу использования концентрата чайного гриба в качестве лечебного средства для местного применения при стафилококковой и синегнойной инфекциях, вызванных устойчивыми к антимикробным антибиотикам штаммами.

Биологически активное вещество чайного гриба, обладающее фунгистатическим действием на некоторые грибы, не является белком; кипячение в течение 30 мин не приводило к снижению его действия, что позволяет накапливать и длительное время хранить препарат в сухом виде.

УСТОЙЧИВОСТЬ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS* И *ASCOSPHAERA APIS* К ТЕКУЧЕМУ ПАРУ

Мукминов М. Н., Назарова Н. П.

Казанский государственный университет, Казань

Альметьевский филиал Казанского КТУ, Альметьевск

В контексте разработки средств профилактики и борьбы с грибковыми заболеваниями пчел, а так же с учетом требований, предъявляемым к тест-микроорганизмам, используемым для разработки режимов дезинфекции важнейшей характеристикой возбудителей микозов является устойчивость последних к текущему пару.

Испытаниям были подвергнуты изоляты *Aspergillus niger* Tieghem, *A. flavus* Link, *A. fumigatus* Fres и *Ascospaera apis*, выделенные с неблагополучных по микозам пасек Альметьевского района Республики Татарстан.

Для определения устойчивости спор возбудителей аспергиллеза и аскофероза пчел к действию текущего пара (100°С) использовали специально изготовленный стеклянный прибор с тремя отверстиями: одно отверстие посредством стеклянного патрубков соединялось с 0,5 литровой колбой, на 1/2 заполненной водой и установленной на электрическую плитку; второе отверстие - для установки термометра, а третье отверстие использовалось для установки металлической сетки-подложки с деревянной ручкой. Всю установку закрепляли на штативе. Стерильные бязевые тест-объекты (1см x 1см) в количестве 50 штук помещали в чашки Петри на поверхность стерильной фильтровальной бумаги, заливали 10 мл взвесью спор гриба, в концентрации 20×10^4 кл/мл равномерно смачивая их. Затем тест-объекты переносили, накрывали их сверху такой же стерильной бумагой. Через 10 мин после удаления избытка жидкости для фиксации элементов гриба на тест-объектах последние переносили в стерильные чашки Петри на поверхность сухой стерильной фильтровальной бумаги и подсушивали в термостате при 30°С в течение 20 мин с приоткрытой крышкой.

Стерильным пинцетом на сетчатую подложку клали из ранее подготовленной чашки Петри, инфицированные спорами того или иного гриба бязевые тесты в количестве 6-8 шт. Доводили температуру воды в колбе до 100-101°С (текущий пар), контролируя термометром, периодически вставляемым в выходное отверстие пара. После чего сетчатую подложку с бязевыми тестами вводили в паровую камеру стеклянного прибора на заданную экспозицию: 1-2; 2-4; 4-6; 6-8; 8-10; 10-12; 12-14 мин. Через каждые 1-2 мин подложка вынималась, а бязевые тесты стерильным пинцетом переносили в пробирки с жидкой средой Сабуро и в чашки Петри с плотной средой Чапека (грибы рода *Aspergillus*) и Сабуро (*Ascospaera apis*) и помещались в термостат при t 30-32°С и инкубировали в течение 14 суток. Все опыты сопровождалось контролем.

При рассмотрении паростойчивости отобранных производственных штаммов возбудителей микозов пчел наиболее высокую устойчивость по отношению к текущему пару (100°С) проявили споры гриба *Ascospaera apis* – 10 мин. и *Aspergillus niger* – 6 мин. Наименьшая устойчивость зафиксирована у спор *Aspergillus flavus* и *Aspergillus fumigatus*, которая составляла 5 мин соответственно.

Таким образом, споры указанных штаммов грибов, которые выдерживали действие текущего пара более 5 минут, в соответствии с требованиями по дезинфекции были в дальнейшем использованы для изыскания и разработки средств и режимов дезинфекции объектов пчеловодства при микозах.

РАЗРАБОТКА ПРОТИВОПЛЕСНЕВОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА

Петрова Е. А., Барабанова Н. В., Нагула М. Н., Кузнецова Л. С.

Московский государственный университет прикладной биотехнологии, Москва

Потеря качества пищевой продукции вследствие поражения микроорганизмами наиболее распространена. Ведущая роль в поражении поверхности продуктов питания принадлежит плесневым грибам. Именно эти микроорганизмы продуцируют высокотоксичные вещества, отрицательно сказывающиеся на качестве продукта и его безопасности. Поэтому вопрос обеспечения безопасности пищевых продуктов путем предотвращения развития на их поверхности плесневых грибов является актуальным для современной пищевой промышленности.

В настоящее время существует множество надежных и эффективных средств защиты поверхности продуктов – методы физического и механического воздействия, использование химических консервантов. Однако вещества химического происхождения неблагоприятно сказываются на здоровье человека. Поэтому в последние годы обращают на себя внимание добавки и средства защиты пищевых продуктов на основе природных соединений. Одним из таких соединений является хитозан, на основе которого в последние годы предлагаются защитные покрытия и пищевые композиции для сохранения качества рыбной продукции и твердых сыров. В настоящее время перспективным направлением является получение противоплесневых композиций на основе хитозана и различных антимикробных добавок природного происхождения для защиты поверхности мясной цельнокусковой продукции.

В представленном сообщении была проведена оценка противоплесневых свойств разномолекулярного хитозана отечественного и импортного производства. Для исследований образцы хитозана растворяли в органических кислотах пищевого назначения (пропионовая, молочная, янтарная, уксусная), растворах их солей, а также буферных системах на их основе.

В качестве тестовых культур были выбраны плесневые грибы *Penicillium rugulosum* ВКМ F-3941, *Penicillium expansum* ВКМ FW-3086, *Penicillium commune* ВКМ FW-3083, *Penicillium aurantiogriseum* ВКМ FW-3060, выделенные нами в производственных условиях современных мясоперерабатывающих предприятий и чаще всего обнаруживаемые на поверхности мясных продуктов. Указанные грибы являются частью коллекции микроорганизмов МГУПБ.

Результаты выполненных исследований показывают, что растворы всех исследованных хитозанов препятствуют развитию тестируемых плесневых грибов, причем наибольшую фунгистатическую активность проявляли растворы хитозанов в уксусной кислоте. Растворы хитозанов в янтарной кислоте характеризовались низкой противоплесневой активностью по отношению к изучаемым грибам. Среди анализируемых хитозанов наибольшим фунгистатическим действием в отношении всех штаммов исследуемых грибов обладали растворы на основе хитозанов с ММ 50-110 кДа и ММ 40-50 кДа.

В результате выполненных исследований выбраны рациональные концентрации хитозана и пищевых кислот, которые могут использоваться в качестве основы для разработки пленкообразующих составов, предназначенных для защиты поверхности и сохранения качества мясной продукции.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ НАНОСЕРЕБРА И НИТРАТА СЕРЕБРА НА РОСТ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОСЕРЕБРА ДЛЯ ЗАЩИТЫ РЕСТАВРАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ

Ребрикова Н. Л.

Государственный научно-исследовательский институт реставрации, Москва

В последнее время предлагается использовать наночастицы (НЧ) серебра для повышения биостойкости различных материалов. Антимикробные свойства металлического серебра и его соединений хорошо известны. Бактерицидное и фунгицидное действие металлического серебра связано с его медленным окислением и высвобождением ионов Ag^+ в окружающую среду. В растворах НЧ количество свободных ионов серебра незначительно и они не вносят или вносят небольшой вклад в антимикробное действие, которое обусловлено тем, что под действием кислорода воздуха на поверхности НЧ образуются хемосорбированные ионы Ag^+ . Антимикробный эффект НЧ сильно зависит от размеров и возрастает с его уменьшением. Уменьшение размера НЧ увеличивает удельную поверхность биоцида и его суммарную активность. НЧ малого размера (<10 нм) способны к взаимодействию с клеточной оболочкой и могут внедряться в цитоплазматическое пространство.

Исследованию бактерицидных НЧ серебра уделяется большое внимание, значительно меньше работ, в которых в качестве тест-культур используются грибы. В биологической лаборатории ГосНИИР проведено сравнительное исследование влияния НЧ серебра и азотнокислого серебра на рост микроскопических грибов. Изучено действие препаратов Ag1 (НЧ серебра в воде), Ag2 (НЧ серебра в изооктане), полученных путем биохимического синтеза, и препарата Ag3 - НЧ серебра в воде, стабилизированные поли(N-винил-2-пирролидоном). Действие биоцидов оценивали по скорости роста тест-культур. В качестве тест-культур использовали *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Ulocladium ilicis*.

Фунгицидная активность НЧ серебра (в пересчете на массовую долю серебра) оказалась существенно выше, чем у ионов серебра. Препараты Ag1 и Ag2 оказывали ингибирующее действие на уровне 95-100% при концентрации 4 мкг/мл, тогда как ингибирующее действие $AgNO_3$ было на уровне 55-85% при концентрации 600 мкг/мл. Препарат Ag3 оказался более слабым фунгицидом, но и его фунгицидная активность была в три раза выше, чем активность $AgNO_3$. Высокая эффективность препаратов Ag1 и Ag2 в отношении подавления развития грибов связана с тем, что в распределении НЧ частиц по размерам в них велика доля НЧ малых размеров - 60-70% частиц размером 2-20 нм.

Применение $AgNO_3$ в реставрационной и музейной практике практически неизвестно, что связано с потемнением его под воздействием света. Фунгицидное действие НЧ серебра намного превосходит $AgNO_3$, они также отличаются по другим характеристикам, поэтому были проведены испытания их в качестве биоцидов для защиты реставрационных материалов. В практике реставрации икон и золоченой резьбы используются клеи, полученные из соединительной ткани млекопитающих или рыб, а также желток куриного яйца, которые представляют собой хорошую питательную среду для микроскопических грибов и других микроорганизмов. Условия, в которых находятся иконостасы, во многих случаях требуют обеспечения биостойкости реставрационных материалов. Исходя из результатов испытания действия препаратов наносеребра на культуры грибов, в реставрационные материалы биоциды вносили в количестве 3 и 6%, в пересчете на массовую долю серебра от 6 до 12 мкг/мл. В использованных концентрациях препараты на основе НЧ серебра не обеспечивали необходимый уровень защиты от повреждения микроскопическими грибами реставрационных материалов и красочного слоя темперной живописи. Использовать их в более высоких концентрациях было невозможно, так как введение препаратов Ag1 и Ag2 вызывало окрашивание клеев в желтый цвет, клеи с добавкой Ag3 темнели на свету.

ПРОТИВОЛУЧЕВЫЕ СВОЙСТВА БИС ПЕНТАМЕТИЛЦИКЛОПЕНТАДИЕНЛЬНОГО КОМПЛЕКСА РОДИЯ И РУТИНАТОВ АММОНИЯ, МЕДИ, КОБАЛЬТА

Рзаев А. А., Гараюсифова А. К., Шамилов Э. Н., Ахмедов И. Д., Абдуллаев А. С., Джафаров Г. М., Мурадов П. З.

Институт Микробиологии, НАН Азербайджана, Баку

Институт Радиационных Проблем, НАН Азербайджана, Баку

Институт Химических Проблем, НАН Азербайджана, Баку

Ионизирующая радиация является одним из многих видов излучений и естественных факторов окружающей среды. Наиболее важными для человека видами излучений, с которыми он сталкивается в условиях повседневной жизни, профессиональной деятельности и в случаях возникновения радиационных аварий, являются рентгеновское и гамма-излучения, нейтроны, альфа- и бета-лучи.

Под действием радиации изменяются клетки и ткани организма, нарушается обмен веществ, в результате чего подавляется рост, появляются организмы, отличающиеся от нормальных, называемые мутантами, поэтому вопросы их влияния на все проявления жизни занимают важное место среди проблем современного естествознания.

Таким образом, перед современной наукой стоят важные задачи: во-первых, точно измерить дозу ионизирующего излучения, попадающую в организм; во-вторых, изучить само действие ионизирующих лучей на живые организмы; в-третьих, найти средства и методы для защиты живых организмов (в особенности людей) от повреждающего действия радиации.

Основной целью нашего исследования являлось изучение противолучевых действий комплексов металлов – рутинатов аммония NH_4Rut , меди $\text{Cu}[\text{Rut}]_2$, кобальта, а также пентаметил циклопентадиенил родия $[\text{Me}_5\text{Cp}]_2\text{Rh}$ при гамма облучении на макромицетах, конкретно на *Pleurotus ostreatus* и *Trametes versicolor*. Грибы облучали на установке К-25 (источник облучения ^{60}Co , мощность дозы 42 рад/сек) при дозах 750, 1000, 1250, 1500 Грэй.

Действие комплексов металлов было оценено по скорости роста колоний грибов *P. ostreatus* и *T. versicolor*. При этом было установлено, что при росте поглощенных доз устойчивость колоний к действию гамма облучения увеличивается.

Было обнаружено, что при добавлении к среде 0, 01%-ного водно-спиртового раствора пентаметилциклопентадиенил родия $[\text{Me}_5\text{Cp}]_2\text{Rh}$ перед облучением, в указанных выше дозах, рост и развитие грибов, увеличивается по сравнению с контрольными вариантами. Это показывает выражение стимулирующего и противолучевого действия комплекса родия.

По мере увеличения доз облучения, противолучевое и стимулирующее действие металл комплекса родия, постепенно уменьшается, а в дозе 1500 Грэй имеет минимально низкую оценку. Выше 1500 Грэй рост и развитие колоний грибов полностью останавливалось.

Параллельно нами проведены эксперименты в присутствии комплексов рутина. Рутин предварительно выделен из экстракта японской софоры (*Sophora japonica*), после чего были получены его комплексные соли, то есть рутинаты аммония, меди и кобальта. Выявлено, что в вышеуказанных дозах рутинаты (NH_4Ru , $\text{Cu}[\text{Rut}]_2$, $\text{Co}[\text{Rut}]_2$) действовали намного слабее, чем родиевый комплекс. Среди рутиновых комплексов по сравнению с родиевым, менее выраженные противолучевые действия показал рутинат аммония NH_4Ru , а рутинаты меди $\text{Cu}[\text{Rut}]_2$ и кобальта $\text{Co}[\text{Rut}]_2$ показали слабо выраженные противолучевые действия.

Таким образом, результаты экспериментов проведенных нами, показали явно выраженное противолучевое действие комплекса родия и несколько ослабленное действие рутината аммония при концентрациях 0, 01%, по сравнению с рутинатами меди и кобальта.

ВЛИЯНИЕ 1, 1 ДМГ НА МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA* И *FUSARIUM*

Рукавицина И. В., Чуркина Г. Н.

НПЦ зернового хозяйства имени А. И. Бараева, Научный, Казахстан

Загрязняющие вещества могут оказывать существенное воздействие на все стадии жизненного цикла микроскопических грибов. У чувствительных к воздействию видов реакция проявляется в увеличении лаг-периода, снижении уровня прорастания, остановке развития ростковых трубок и т. д., у устойчивых в виде активации - уменьшении времени и увеличении уровня прорастания, увеличении скорости роста мицелия [Марфенина, 2005]. Характер действия любого токсического соединения зависит, прежде всего, от его концентрации [Карасевич, 1982].

Целью исследований являлось изучение влияния различных концентраций 1, 1 ДМГ (диметилгидразина) на морфолого-культуральные признаки грибов *Alternaria* и *Fusarium*.

При культивировании грибов на питательной среде с добавлением 1, 1 ДМГ дозе 5, 25 и 50 мг/мл изменялась интенсивность роста грибов, окраска воздушного и субстратного мицелия, его консистенция. Изменения происходили и в морфологии микромицетов.

На 8 сутки культивирования при добавлении в среду 1, 1 ДМГ в дозе 5, 25 и 50 мг/мл происходило торможение роста колонии гриба *Alternaria spp.* (штамм 14). При концентрации 50 мг/мл диаметр колонии достигал 50 мм, в сравнении с контролем (без внесения 1, 1 ДМГ) - 70 мм. На 14 сутки диаметр колонии гриба при концентрации 5 мг/мл находился на уровне контроля и составлял 90 мм, что свидетельствует о возможной адаптации *Alternaria spp.* к 1, 1 ДМГ, а при концентрации 25 и 50 мг/мл, диаметр колоний составлял 84 и 83 мм соответственно. При микроскопических исследованиях отмечены изменения в морфологии *Alternaria spp.* При концентрации 1, 1 ДМГ 5 мг/мл формировались 2, 3- и 6-клеточные конидии, утолщенный, септированный мицелий с гранулированным содержимым внутри септ; концентрация 25 мг/мл способствовала формированию 5-6 клеточных прорастающих, шиповатых конидий, а также мицелиальных тяжей. При внесении в среду 50 мг/мл 1, 1 ДМГ образовывались 4, 5, 9 клеточные муральные, прорастающие, шиповатые конидии темно-коричневого цвета. Формировался септированный, мелкогранулированный мицелий.

У грибов *F. oxysporum* (штамм 28/33) и *F. graminearum* (штамм 6/10) при добавлении в среду 5 мг/мл 1, 1 ДМГ на 8 сутки культивирования диаметр колоний незначительно превышал контроль, а к 14 суткам рост приостанавливался. При внесении 25 мг/мл и особенно 50 мг/мл 1, 1 ДМГ диаметр колоний был несколько меньше, чем на контрольном варианте, особенно это сильно проявилось у гриба *F. graminearum* на 8 сутки культивирования, где диаметр колонии составлял 30 мм в сравнении с контролем - 51 мм. Аналогичное явление наблюдалось и на 14 сутки. Следует отметить, что гриб *F. graminearum* оказался более чувствительным к наличию загрязняющего вещества в среде.

У *F. graminearum* (штамм 6/10) при концентрации 5 мг/мл 1, 1 ДМГ формировался гранулированный мицелий, а при концентрации 25 мг/мл и особенно 50 мг/мл 1, 1 ДМГ - утолщенный, местами сильно вакуолизированный, формировались промежуточные хламидоспоры, которые, как известно, являются своеобразной стадией покоя, в которой гриб может пребывать длительное время. У гриба *F. oxysporum* (штамм 28/33) при добавлении в среду 1, 1 ДМГ в дозе 5 мг/мл происходило утолщение мицелия и образование вакуолей, что обычно наблюдается при старении клеток. При концентрации 25 мг/мл и 50 мг/мл 1, 1 ДМГ также формировался утолщенный, гранулированный мицелий, образовывались промежуточные хламидоспоры и мицелиальные тяжи. Конидиеобразование не происходило.

Таким образом, проведенные исследования показали, что различные концентрации 1, 1 ДМГ способствуют задержке роста грибов, а также вызывают изменения морфологии конидий и мицелия. Увеличение концентрации 1, 1 ДМГ до 50 мг/мл способствует формированию покоящихся структур у грибов рода *Fusarium* - мицелиальных тяжей и хламидоспор, что свидетельствует о неблагоприятных факторах для существования последних.

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ И ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

Семенова С. А., Галиуллин А. К., Матросова Л. Е., Тремасов М. Я.

Казанская ГА ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана, Казань

Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности, Казань

Из всех объектов внешней среды наибольшее количество микроорганизмов содержит почва, т. к. в ней микробы находят благоприятные условия для своей жизнедеятельности: влагу, питательные вещества, защиту от губительного действия прямых солнечных лучей. Микрофлора почвы состоит из микробных популяций актиномицетов, бактерий, микроскопических грибов, водорослей и простейших. Часто почва является вторичным резервуаром для патогенных микроорганизмов, попадающих в почву с выделениями человека и животных (например, возбудитель сибирской язвы). Бактерии попадают в почву с фекалиями человека и животных, прочими выделениями, а также с трупами погибших животных. При благоприятных условиях они могут размножаться и сохраняться длительное время в виде спор. Основные факторы, приводящие к быстрой гибели микроорганизмов, — неспособность к спорообразованию и антагонистические свойства микрофлоры почвы (конкуренция за источники энергии и питания).

Антагонизм широко распространен в природных микробных сообществах, состоящих из бактерий, грибов, актиномицетов, и других микроорганизмов, который включает и такие формы взаимоотношений, как конкуренция, хищничество, паразитизм. Взаимоотношения, обусловленные продукцией любых антимикробных веществ, можно назвать активным или прямым антагонизмом. В отличие от него существует пассивный, или косвенный, антагонизм, при котором подавление одних микроорганизмов происходит за счет изменения другими микробами условий окружающей среды в неблагоприятную для развития сторону. Антагонизм может быть односторонним (микроорганизм подавляет развитие своего конкурента, не реагируя на воздействие соперника) и двусторонним (происходит взаимное угнетение микроорганизмов в сообществе). Существует понятие направленного (насильственного), или вынужденного, антагонизма. При этих взаимоотношениях наблюдается образование антимикробных веществ (вероятно, различной природы, обладающих разным механизмом действия) только при совместном выращивании двух различных микроорганизмов, которые в условиях изолированного культивирования этих веществ не образуют.

В настоящее время перспективным направлением является разработка безопасных и эффективных биологических средств борьбы с патогенными грибами и микроорганизмами которая предполагает широкое применение препаратов на основе бактерий-антагонистов и их метаболитов, проявляющих активность против широкого спектра грибных патогенов. Для эффективного использования таких средств существенное значение приобретают накопленные знания о механизмах микробного взаимодействия на уровне антагонист – патоген.

Нами была проведено скрининговое исследование антагонистических свойств у различных микроорганизмов (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* и др.) и микромицетов. Антагонистические свойства изолированных микроорганизмов по отношению к микромицетам проверяли на специализированных питательных средах методом «Отсроченного антагонизма», с последующим инкубированием в термостате в различные сроки. Результаты исследования показали, что прослеживается выраженная антагонистическая активность между культурами *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* и микроскопическими грибами родов *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*.

ВЛИЯНИЕ ВОДНЫХ НАСТОЕВ РАСТЕНИЙ НА ДРОЖЖЕВЫЕ ГРИБЫ

Скоробогатова Р. А.¹, Жебрак И. С.¹, Сайко О. В.¹, Гончарова Д. Д.¹, Кожевин П. А.²

1 Гродненский государственный университет имени Я. Купалы, Гродно

2 Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

Дрожжи как возбудители микозов приобретают в последнее время все большее значение. Одним из наиболее распространенных микозов является кандидоз. Кандидемия признана нозологической формой инфекции (Елинов Н. Н., 2000). Однако у иммунокомпроментированных пациентов при фунгемиях в посевах крови обнаруживается наряду с *Candida spp.*, *Geotrichum spp.*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*. В связи с тенденцией к росту грибных заболеваний и выявлением среди возбудителей их резистентности к лекарственным препаратам химического и природного синтеза большое внимание уделяется поиску альтернативных антифунгальных препаратов. С этой целью привлекается опыт народной медицины по использованию растительных настоев.

Нами исследовалось влияние водных настоев различного растительного сырья на рост *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*. В готовые настои и воду (для контроля) вносили водную взвесь живых дрожжевых культур. Через сутки из настоев и контроля готовили серию разведений, которые высевали в глюкозо-пептонный агар с последующим учетом роста колоний. Влияние водных настоев растений оценивали по количеству КОЕ в процентном выражении по отношению к контролю (100%). Одновременно использовали новый метод мультиреспирометрического тестирования (МРТ) в модификации П. А. Кожевина. В 24-луночные планшеты (NUNC, Denmark) вносили 0,5 мл дрожжевой суспензии, водные настои исследуемого растительного сырья и минеральный солевой состав. В крышку планшета заливали солевой агар с индикатором для регистрации CO₂. Интенсивность окраски в ячейках определяли колориметрически. Метод МРТ использовали для составления смесей лекарственных растений и исследования кумулятивного эффекта их действия.

В результате выполненного эксперимента было установлено стимулирующее действие на размножение *Candida albicans* листьев грецкого ореха (*Juglans regia* L. – 137,6%), перегородок из плода грецкого ореха (214,0%), плодов можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L. – 120,3%). Одновременно установлено ингибирующее действие трав иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L. – 14,8%), шалфея мутовчатого (*Salvia verticillata* L. – 39,7%), розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis* L. – 23,9%), чистотела большого (*Chelidonium majus* L. – 37,2%); побегов багульника болотного (*Ledum palustre* L. – 1,9%), туи западной (*Thuja occidentalis* L. – 57,5%); шишек хмеля обыкновенного сорт Норсан Брэвор (*Humulus lupulus* L. – 36,6%). Смесью трав багульника болотного, иссопа лекарственного, розмарина лекарственного и туи западной также ингибировала рост *Candida albicans* (3,7%). По отношению к *Saccharomyces cerevisiae* достоверное ингибирующее действие оказывал только сбор четырех трав. Стимулирующим эффектом обладал шалфей, чистотел, туя, кора и листья грецкого ореха. Иссоп, розмарин и перегородки грецкого ореха, шишки хмеля показали недостоверную степень угнетения. При помощи метода МРТ ингибирующее и стимулирующее действие настоев исследуемого растительного сырья были подтверждены.

Полученные результаты можно использовать в фитотерапии кандидомикозов, а метод МРТ для составления композиций-сборов из нескольких растений для фиксации кумулятивного эффекта.

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ КВМ-101

Слобожанюк Ю. П., Фурман О. С., Суворова З. С., Врынчану Н. А., Короткий Ю. В.

ГУ «Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины», Киев

Поиск новых соединений с антимикробными свойствами и разработка на их основе эффективных препаратов – один из путей борьбы с антибиотикорезистентностью. Возникновению и распространению резистентных штаммов грибов способствует нерациональное использование антибиотиков, особенно широкого спектра действия, длительный прием цитостатиков, гормональных препаратов, неблагоприятная экологическая обстановка и т. д. Микозы часто обнаруживаются у лиц с трансплантацией органов, у пациентов онкологического профиля, ВИЧ-инфицированных, больных туберкулезом, сахарным диабетом и т. д. Немаловажная роль в возникновении устойчивости принадлежит и ятрогенному фактору (Ю. Н. Максимов, 2008). Увеличение резистентности к антифунгальным препаратам обуславливает сложность терапии микозов и диктует необходимость внедрения в клиническую практику новых, более эффективных антигрибковых средств.

Выраженные антифунгальные свойства обнаружены у веществ природного происхождения (растительное сырье, продукты биотехнологии) и у веществ, полученных путём химического синтеза (модификация известных антибиотиков, комбинированное использование антимикробных препаратов, синтез новых химических веществ). Среди последних, на внимание заслуживают вещества каркасного строения. Так, активные ингибиторы роста и размножения грибов обнаружены среди адамантансодержащих соединений (Н. Н. Дёнысюк, 2006; Н. А. Врынчану, 2007)

Цель. Изучить антифунгальную активность соединения каркасного строения КВМ-101.

Антигрибковые свойства соединения КВМ-101 исследованы методом микроразведений в жидкой питательной среде Сабуро с установлением минимальной подавляющей концентрации (МПК). Эксперименты проведены по отношению к *C. albicans* NCTC 885\653, *C. glabrata* УКМу-2383, *C. parapsilosis* УКМу-73, *C. tropicalis* УКМу-2473. Плотность инокулята составляла 10^6 грибных элементов/мл питательной среды. Соединение растворяли в 0,9 % растворе NaCl. Планшеты инкубировали в термостате на протяжении 24 часов при 33°C. Концентрации соединения КВМ-101 составляли 40,0 мкг/мл – 0,31 мкг/мл.

Проведенными экспериментами установлено, что МПК соединения КВМ-101 составляет: по отношению к *C. glabrata* – 2,5 мкг/мл, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* и *C. albicans* – 1,25 мкг/мл.

Полученные данные свидетельствуют о наличии у вещества КВМ-101 антифунгальных свойств и перспективности дальнейшего поиска активных соединений среди веществ каркасного происхождения. Необходимо также провести эксперименты для установления спектра антифунгальной и антибактериальной активности КВМ-101 и изучения механизма его ингибирующего действия.

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ДРОЖЖЕЙ РОДА *SACCHAROMYCES* К ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ

Снисаренко Т. А. Костяев А. Е.

Московский государственный областной университет

Дрожжи рода *Saccharomyces* относятся к низшим грибам. Всего насчитывается порядка 18 представителей данного рода. Дрожжи широко распространены в природе, особенно там, где имеются сахаристые вещества (ягоды, фрукты, нектар цветов, молочные продукты и т. д.) (М. В. Горленко, 1978; Г. А. Белякова, 2006). Изучение дрожжей рода *Saccharomyces* и многих других родов дрожжей и дрожжеподобных грибов является перспективным направлением в биотехнологии. Сейчас дрожжи используются для получения различных ферментных препаратов, органических кислот, полисахаридов, многоатомных спиртов, а также во множестве других мелкомасштабных процессах (А. А. Баев, 1982; Е. А. Васильева и др. 1978).

Целью работы явилось изучение устойчивости пивных дрожжей (*Saccharomyces carlsbergensis*) и пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) к действию антибиотиков АМОКСИКЛАВ (АМОКСИЦИЛЛИН+КЛАВУЛАНИЧЕСКАЯ КИСЛОТА) и ЛИНЕЗОЛИД. Анатомические и систематические особенности дрожжей и дрожжеподобных грибов являются хорошо изученными, но физиологические и особенности изучены недостаточно (Л. А. Лебедева, 1976). Используемая нами методика является перспективной и может быть рекомендована как для изучения дрожжей рода *Saccharomyces*, так и для изучения других родов дрожжей и дрожжеподобных грибов.

Объектами исследования были выбраны пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) и пивные дрожжи (*Saccharomyces carlsbergensis*). В работе было изучено влияние антибиотиков АМОКСИКЛАВ (АМОКСИЦИЛЛИН+КЛАВУЛАНИЧЕСКАЯ КИСЛОТА), и ЛИНЕЗОЛИД на рост и размножение дрожжей. Данная работа проводилась в двух вариантах. Для работы были приготовлены растворы пивных и пекарских дрожжей.

Первый вариант исследования.

В 10 одинаковых пробирок было налито примерно по 5 мл раствора пивных дрожжей. Затем в пробирки № 1 – 5 был погружен антибиотик АМОКСИКЛАВ (АМОКСИЦИЛЛИН+КЛАВУЛАНИЧЕСКАЯ КИСЛОТА), в пробирки № 5 – 6 был погружен антибиотик ЛИНЕЗОЛИД. Антибиотик был погружен в пробирки в следующей последовательности: 1 пробирка – 1 диск антибиотика АМОКСИКЛАВ, 2 пробирка – 2 диска антибиотика, 3 пробирка – 3 диска, 4 пробирка – 4 диска, 5 пробирка – без добавления антибиотика, 6 пробирка – 1 диск антибиотика ЛИНЕЗОЛИД, 7 пробирка – 2 диска, 8 пробирка – 3 диска, 9 пробирка – 4 диска, 10 пробирка – без добавления антибиотика.

Второй вариант исследования

В 10 одинаковых пробирок было налито примерно по 5 мл раствора пекарских дрожжей. Затем в пробирки № 1 – 5 был погружен антибиотик АМОКСИКЛАВ (АМОКСИЦИЛЛИН+КЛАВУЛАНИЧЕСКАЯ КИСЛОТА), в пробирки № 5 – 6 был погружен антибиотик ЛИНЕЗОЛИД. Антибиотик был погружен в пробирки в следующей последовательности: 1 пробирка – 1 диск антибиотика АМОКСИКЛАВ, 2 пробирка – 2 диска антибиотика, 3 пробирка – 3 диска, 4 пробирка – 4 диска, 5 пробирка – без добавления антибиотика, 6 пробирка – 1 диск антибиотика ЛИНЕЗОЛИД, 7 пробирка – 2 диска, 8 пробирка – 3 диска, 9 пробирка – 4 диска, 10 пробирка – без добавления антибиотика.

Результаты работы и выводы.

В начале работы было обнаружено то, что активное деление дрожжевой клетки наблюдается в пробирках с наименьшей концентрацией антибиотика. Затем пробирки с антибиотиком были оставлены в лаборатории микробио-

логии на несколько дней. Через несколько дней исследование было продолжено. При изготовлении мазков пивных (*Saccharomyces carlsbergensis*) и пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), было обнаружено, что пивные дрожжи обладают 100% летальностью по сравнению с пекарскими дрожжами. Это говорит о том, что под действием использованных нами антибиотиков произошёл лизис клеток *Saccharomyces carlsbergensis*. Затем были приготовлены и окрашены мазки *Saccharomyces carlsbergensis* и *Saccharomyces cerevisiae* из различных повторностей первого и второго вариантов. Мазки были окрашены по методике Грама (1884). После микроскопии мазков *Saccharomyces carlsbergensis* было обнаружено, что в пробирках произошла 100% летальность дрожжевых клеток. После микроскопии мазков *Saccharomyces cerevisiae* было обнаружено, что в пробирках с небольшими концентрациями антибиотика отмечается некоторая активность дрожжевых клеток и неполная их гибель.

Таким образом, устойчивость *Saccharomyces cerevisiae* к действию антибиотиков АМОКСИЛАВ (АМОХИЦИЛЛИН+КЛАВУЛАНОВАЯ КИСЛОТА) и ЛИНЕЗОЛИД выше, чем у *Saccharomyces carlsbergensis*. Установленные различия в устойчивости пекарских и пивных дрожжей к действию антибиотиков обусловлены физиологическими и биохимическими особенностями дрожжей.

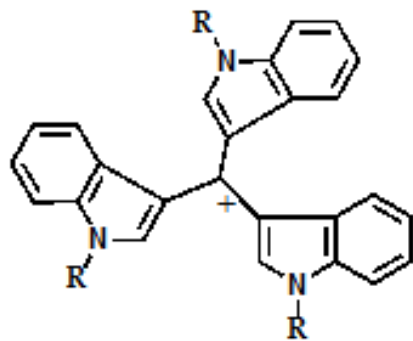
ФУНГИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИИНДОЛИЛМЕТАНА: РОЛЬ N-АЛКИЛЬНЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В ПРОЯВЛЕНИИ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ

Тренин А. С., Лавренов С. Н., Преображенская М. Н.

НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва

В целях создания новых более эффективных препаратов, обладающих выраженным фунгицидным действием, проведен химический синтез новых производных трис(1-алкилиндололиндол-3-ил)метана и их солей – аналогов антибиотика турбомицина А, впервые выделенного при ферментации дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* и обладавшего выраженным антимикробным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Проведенный нами синтез позволил получить новые соединения, содержащие в индольных кольцах в качестве заместителей у атомов азота различные алкильные группы. Синтезированные производные трис(1-алкилиндололиндол-3-ил)метана были окислены до соответствующих солей трииндолилметилия, обладающих выраженной противогрибковой активностью, значительно превышающей активность турбомицина.



R = H (турбомицин А)

R = алкил (C1 – C10) (производные)

Изучение противогрибковой активности новых соединений в экспериментах *in vitro* в отношении дрожжей (*Candida albicans*, *Cryptococcus humicola*) и несовершенных грибов (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*) позволяет сделать вывод об увеличении антимикробной активности при увеличении числа атомов углерода в боковых цепях молекулы. Максимум активности в отношении дрожжей и мицелиальных грибов достигается при использовании солей производных, углеродные цепи которых имеют длину C4–C5 (т. е. N-бутильное и N-пентильное производные). Дальнейшее увеличение размера цепей приводит к некоторому снижению противогрибковой активности (у N-гексильного производного) и ее полной утрате у производного с длиной цепочки в C10 (N-децильное производное). Наиболее активные производные, длина алкильной цепи которых составляет C4–C5, не уступают по своей активности известному противогрибковому антибиотику амфотерицину В, взятому в качестве препарата сравнения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение алкильных заместителей и длина углеродных цепей может играть ключевую роль в достижении наивысшей активности трис(1-алкилиндололиндол-3-ил)метанов.

ДЕЙСТВИЕ БИОЦИДОВ НА МОРФОЛОГИЮ МИКРОМИЦЕТОВ

Трепова Е. С., Великова Т. Д.

Федеральный центр консервации библиотечных фондов

Российская национальная библиотека, Санкт-Петербург

Исследовано изменение морфологии клеток *Aspergillus niger* Tiegh. var. *niger* и *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. под действием биоцидов, представленных 5 различными химическими соединениями: производными изотиозола (Санатекс и Анти-В), нециклическими ацеталами, алифатическими азотными и гетероциклическими серо- и азотсодержащими соединениями (Rosima GT), полигексаметиленгуанидином (Фосфопаг) и N,N-диметил-N-фенил'-N'-флю-

оро-дихлорометил-тиосульфамидом (Lichenicida). Микроскопирование осуществляли в течение трех суток в световом микроскопе при увеличении $\times 90$ и в сканирующем электронном микроскопе при увеличении $\times 3000$.

Известно, что одна из причин гибели клеток — изменение проницаемости клеточной стенки и мембран. Обработка водной суспензии спор всеми препаратами в биоцидной концентрации приводила к полной гибели микромицетов: контрольные высевы показали полное отсутствие роста гриба на питательных средах, однако при микроскопировании нежизнеспособных спор и мицелия не всегда было обнаружено отличие в морфологии клеток.

Наибольшее повреждение и спор, и гиф мицелия *Aspergillus niger* наблюдали под действием Фосфопага и Анти-В. Большая часть поверхности гиф микромицета после обработки препаратами Анти-В, Санатекс и Lichenicida была покрыта скоплениями спор, присутствие Санатекс и Lichenicida не вызывало нарушения поверхности клеточной стенки. Шиповатость поверхности спор *A. niger*, обработанных растворами биоцидов Санатекс и Rocima GT, была значительно больше, чем контрольных (не обработанных). В растворе препарата Rocima GT наблюдали очень характерные цепочки спор с перемычками, а в водной суспензии цепочки, характерные для *A. niger*, распадались уже на 1 сутки. После обработки всеми исследованными биоцидами выявлены значительные изменения поверхности спор (от шиповатой в контроле до рифленой), их формы (от округлой до овальной и неправильной формы), а также характера скоплений спор на поверхности гиф.

Под действием биоцидов обнаружено изменение размеров спор микромицета *Alternaria alternata*. Через 24 часа споры, обработанные исследуемыми препаратами в биоцидных концентрациях, значительно уменьшились по сравнению с их первоначальным размером на 7-10 мкм. Самое большое изменение размеров спор наблюдали при обработке препаратом Lichenicida, а наименьшее — полимерным препаратом Фосфопагом. Споры контрольной суспензии не изменились.

Споры *Alternaria alternata*, обработанные препаратами Санатекс и Rocima GT, через трое суток снова увеличились до первоначального размера (31-32 мкм). Размер спор, обработанных препаратами Фосфопаг, Анти-В и Lichenicida, в дальнейшем не изменялся и составлял в среднем 25 мкм. Через 3 суток споры контрольной суспензии тоже уменьшились на 8 мкм, то есть до размера спор, обработанных растворами биоцидов. Споры *A. alternata* были трижды обработаны исследуемыми биоцидами, и эти изменения размеров спор сначала в сторону уменьшения и последующего их увеличения при обработке препаратами Санатекс и Rocima GT подтвердились. Видимых изменений мицелия *A. alternata* под действием исследованных препаратов в биоцидных концентрациях не обнаружено.

При обработке спор *Aspergillus niger* и *Alternaria alternata* препаратами в концентрации, превышающей биоцидную в 10-20 раз, обнаружены различные виды повреждений клеточной стенки исследуемых микромицетов, а также ее видоизменения: многочисленная деформация, вздутия, хламидоспоры.

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В НИЗКИХ ДОЗАХ НА *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* (FRES.) DE VRIES

Тугай Т. И., Тугай А. В., Гамалий И. Н., Бойко Т. Ю.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

Микромицеты, как было установлено ранее, выделенные в результате многолетнего мониторинга чернобыльской зоны отчуждения и объекта «Укрытие» были способны позитивно реагировать на действие ионизирующего излучения, проявляя радиоадаптивные свойства: радиотропизм, радиостимуляцию, адаптивный ответ (Zhdanova et al., 2004; Tugay et al., 2006; Тугай и др., 2007). Частота проявления этих свойств зависела от радиоактивности места их выделения и, соответственно, от поглощенной дозы. Однако до настоящего времени в литературе нет данных относительно числового выражения величины малых доз для микроскопических грибов.

Целью данной работы было выявление ответных реакций *Cladosporium cladosporioides* на рост в условиях облучения, когда поглощенная доза колебалась в пределах от 1 до 5 Гр.

Объектом исследования были штаммы *Cladosporium cladosporioides*, выделенные из зоны отчуждения и проявлявшие радиоадаптивные свойства и соответственно контрольные, выделенные из чистых территорий, и не проявлявшие таких свойств.

Для оценки реакции грибов на действие низких, по нашему мнению, доз ионизирующего излучения была использована модельная установка, где основным источником гамма излучения был ^{137}Cs .

Было показано, что при дозах 1, 2 Гр, 2, 2 Гр, 3 Гр происходит увеличение радиальной скорости роста штаммов *C. cladosporioides*, проявляющих радиоадаптивные свойства, а у контрольных штаммов – выявлено либо снижение скорости, либо отсутствие влияния.

Было исследована выживаемость штаммов, после воздействия интегральной поглощенной дозы 5 Гр. Было показано, что у исследованных видов выживаемость составляла практически 100%, в сравнении с контролем, без облучения, что может свидетельствовать о том, что данная поглощенная доза является малой для этих грибов. Согласно концепции Кузина, при действии малых доз основным механизмом ответных реакций радиоустойчивых организмов является изменение регуляторных функций организма.

Было исследовано влияние ионизирующего излучения в указанном диапазоне доз на активность антиоксидантных ферментов штаммов *C. cladosporioides*, проявляющих и не проявляющих радиоадаптивные свойства. .

Выявлены существенные, в несколько раз, колебания в активности антиоксидантных ферментов, каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы, что свидетельствует о их существенной роли в ответных реакциях организма на воздействие ионизирующего излучения в дозах от 1 Гр до 5 Гр. Однако, изменения в активности антиоксидантных ферментов при действии данного диапазона доз излучения существенно отличались у штаммов, проявляющих радиоадаптивные свойства и контрольных, этими свойствами не обладающих.

Таким образом, выявленный нами комплекс ответных реакций *C. cladosporioides* на воздействие облучения в дозах до 5 Гр, свидетельствует о том, что эти дозы для исследуемых микромицетов являются малыми.

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА АНТИМИКОТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ШТАММОМ *BACILLUS SUBTILIS* ИБ-54 – АНТАГОНИСТОМ ГРИБОВ-ДЕРМАТОФИТОВ

Усманов В. И.¹ Галимзянова Н. Ф.¹, Мелентьев А. И.¹, Актуганов Г. Э.¹, Гиззатуллина С. В.² Лукманова К. А.³

1 Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа

2 Филиал «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО Микроген», Уфа

3 Башкирский государственный медицинский университет Росздрава, Уфа

Важной задачей в борьбе с микотическими инфекциями и, в частности, дерматомикозами, является поиск и характеристика новых соединений природного происхождения, эффективно подавляющих рост грибов и малотоксичных для человека и животных. Бациллы и другие аэробные спорообразующие бактерии, наряду с представителями *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Gliocladium* и *Trichoderma*, могут рассматриваться, как один из объектов, имеющих наибольший потенциал в системах поиска и скрининга новых соединений для разработки противогрибковых средств. Ранее нами была продемонстрирована высокая антагонистическая активность штамма *B. subtilis* ИБ-54 в отношении грибов-дерматофитов, и опытами *in vivo* (доклинические испытания) подтверждена его эффективность в составе опытного средства наружного применения при профилактике и лечении моделей дерматомикозов (Мелентьев А. И. с соавт., 2004; Лукманова К. А. с соавт., 2008, 2009). Целью настоящей работы являлось изучение особенностей продукции активных антимикотических соединений штаммом *B. subtilis* ИБ-54 в монокультуре, а также их выделение и оценка воздействия на клинические штаммы грибов-дерматофитов *in vitro*. Установлено, что антимикотические соединения обнаруживаются в культуральной среде уже в экспоненциальной фазе роста штамма (после 12 ч), однако их концентрация незначительна и возрастает параллельно с ростом культуры, показывая сходные значения в интервале от 12 до 36 ч культивирования. Основное накопление активных метаболитов в среде происходит довольно равномерно между 2-ми и 6-ми сутками культивирования, совпадая с процессом спорообразования штамма. Однако, при синхронной споруляции бактериальных клеток в период 4-5 суток может наблюдаться резкое возрастание (в 4-10 раз) концентрации антимикотических веществ в среде. Расчеты показывают, что продуктивность штамма колеблется в широких пределах (70-140 мкг/мл) в зависимости от условий культивирования. Увеличению роста и продуктивности штамма способствовали высокие концентрации дрожжевого и кукурузного экстрактов в питательной среде (1, 0-2, 0% мас.). Таким образом, динамика секреции антимикотических соединений штаммом *B. subtilis* ИБ-54 показывает, что по механизму синтеза они являются, скорее всего, вторичными метаболитами, как большинство веществ антибиотической природы. В ходе проводимых исследований из культуральной жидкости *B. subtilis* ИБ-54 была выделена суммарная фракция вторичных метаболитов, относящихся к циклическим липопептидам. Тестирование *in vitro* этих соединений против грибов-дерматофитов подтвердило наличие у них антимикотической активности. При концентрации активных метаболитов 20-25 мкг в 1 мл питательной среды рост штаммов *M. canis* подавлялся на 80-90%, *T. gipseum* – на 80-85%, *T. rubrum* – на 55-65%. Полное подавление роста *M. canis* и *T. gipseum* происходило при концентрациях 40-45 и 50-55 мкг/мл, тогда как для *T. rubrum* требовалось не менее 150 мкг/мл. Достаточно высокие значения ингибирующей концентрации обусловлены недостаточной степенью очищенности анализируемых соединений, содержащих до 90% примесей. При микроскопическом анализе культур дерматофитов было установлено, что действие метаболитов сравнимо с действием бактериальной культуры и приводит к серьезным нарушениям в развитии мицелия грибов, либо полному подавлению их прорастания их спор. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 07-04-00812-а.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ГРИБА *NEUROSPORA CRASSA* И БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI* К ТОКСИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ СЕРЕБРА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ДИОКСИДА УГЛЕРОДА

**Филиппович С. Ю., Пшенникова Е. С., Бачурина Г. П., Пономарева В. Д., Малыгин А. Г.
Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН, Москва**

Известно, что серебро в виде солевых или коллоидных растворов обладает мощным противомикробным действием. Вместе с тем, высшие организмы (в том числе и человек) по невыясненным до сих пор причинам практически нечувствительны к его воздействию. Поэтому в настоящее время антимикробные агенты, имеющие се-

ребро в своем составе, широко используются в медицине и пищевой промышленности. Токсичность серебра сильнее всего проявляется в водном растворе и зависит прежде всего от концентрации свободных ионов Ag^+ . Однако степень проявления его токсичности может изменяться в зависимости от таких факторов как pH, присутствие определенных анионов и катионов, а также различных органических соединений. Одним из таких факторов, влияние которого до сих пор не было изучено, является концентрация углекислого газа в окружающей среде. Основанием для поиска зависимости подобного рода послужил обнаруженный ранее необычный эффект, связанный с действием CO_2 , – было показано, что диоксид углерода в низких концентрациях ингибирует реакцию восстановления серебра в процессе окрашивания гелей после электрофореза на белок.

Исследовали действие углекислого газа на выживаемость бактерий *Escherichia coli* и способность конидий гриба *Neurospora crassa* к прорастанию в присутствии нитрата серебра. Для обоих микроорганизмов пробирки с инкубационной смесью (вода или раствор определенной концентрации AgNO_3 + клетки микроорганизма) и заданной концентрацией свежеприготовленного диоксида углерода термостатировали в течение 1 часа, перемешивая каждые 15 мин. Конидии аскомицета *N. crassa* являются покоящейся стадией развития и поэтому еще не выделяют CO_2 на стадии гидратации. Низкий титр бактерий *E. coli* в инкубационной среде использовали для того, чтобы свести к минимуму концентрацию эндогенного CO_2 и уменьшить его влияние на токсичность растворенного серебра. Затем выживаемость клеток *E. coli* и жизнеспособность конидий *N. crassa* определяли плейтингом, то есть используя серию разведений микроорганизмов на чашках Петри с определенной средой (для *N. crassa* необходимо добавление 1% сорбозы, чтобы прорастание конидий осуществлялось в виде колоний), и через 2 дня подсчитывали число образовавшихся колоний.

Для выяснения действия CO_2 на токсичность AgNO_3 по отношению к микроорганизмам сначала были подобраны такие концентрации AgNO_3 , которые приводят к частичному снижению прорастания конидий *N. crassa* и выживания клеток *E. coli*. Установлено, что жизнеспособность конидий гриба после инкубации в растворе $15 \mu\text{M}$ AgNO_3 падает до 21% от водного контроля, а выживаемость бактерий в присутствии $10 \mu\text{M}$ AgNO_3 снижается до 44%. Несмотря на разную биологическую природу, выбранные объекты демонстрировали сходную чувствительность к действию ионов серебра.

Показано, что токсическое действие $10 \mu\text{M}$ AgNO_3 на клетки *E. coli* существенно усиливается по мере увеличения концентрации диоксида углерода над суспензией бактерий и выживаемость бактерий достигает минимального значения при его содержании 6% v/v. При инкубации конидий гриба *N. crassa* в присутствии $15 \mu\text{M}$ нитрата серебра их жизнеспособность падает, но она практически не изменяется при повышении концентрации CO_2 над суспензией спор. Таким образом, диоксид углерода усиливает токсическое действие ионов серебра на клетки прокариота *E. coli*, но не изменяет его в отношении эукариота *N. crassa*.

Обнаруженный эффект различного влияния CO_2 на токсичность серебра в отношении прокариотических и эукариотических микроорганизмов следует учитывать при использовании серебра для обеззараживания воды, а также при терапии грибковых и бактериальных инфекций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00864).

ВЛИЯНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА РОСТ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

Юношева Е. П., Элланская Н. Э.

Национальный ботанический сад имени Н. Н. Гришко НАН Украины, Киев

Современные способы защиты растений от болезней и вредителей сельскохозяйственных культур перенасыщены химическими средствами защиты, которые накапливаются в почве и растениях. Актуальные задачи биологического земледелия требуют использования растений с природными инсектицидными, антимикробными и противовирусными свойствами. Ароматические растения, продуценты эфирных масел, в этом отношении являются интересными объектами исследования. Лавандовое эфирное масло – одно из самых используемых в медицине, обладающее антимикробным эффектом.

Целью данной работы являлось изучение влияния эфирных масел лаванды узколистой (*Lavandula unguistifolia* Mill.) и лавандина (*Lavandula hybrida*) на рост и развитие почвенных микромицетов, которые могут выступать факультативными патогенами и вызывать заболевания растений. Тестовыми культурами являлись два вида рода *Fusarium* (*F. oxysporum* (Schlech.) emend. Snyd. et Hans. *F. solani* (Mart.) App. et Wr.), два – рода *Penicillium* (*P. raciborskii* Zal. es. *P. brevicompactum* Dierckx) и два вида рода *Aspergillus* (*A. ochraceus* Wilhelm, *A. niger* v. Tiegh.). Опыт был проведен с использованием методики бумажных дисков. (Методы экспериментальной микологии. Справочник, 1982) Для исследования были взяты такие концентрации эфирных масел – 0, 3 и 0, 5 мкл. Степень действия оценивалась по зоне задержки роста мицелия вокруг диска с дозой эфирного масла.

Показано, что эфирные масла оказывают фунгистатическое и фунгицидное действие на культуры микромицетов. Ингибирующее действие эфирных масел зависело от их количества; большее количество эфирного масла усиливало его действие. В большинстве опытных вариантов лавандиновое масло проявляло наиболее сильное антифунгальное воздействие. Задержка спороношения наблюдалась у всех исследуемых культур.

Самыми чувствительными к воздействию эфирных масел были грибы рода *Fusarium*. Зоны задержки роста составляли – 2, 5±0, 88 см (для лавандина при концентрации 0, 3 мкл), 2, 2±0, 16 см (для лаванды при той же концентрации). Для грибов рода *Penicillium* задержка роста была меньшей, в то же время ингибирующее действие сохранялось через трое суток. Из двух видов рода *Aspergillus* наиболее устойчивым оказался *A. niger*. Зоны ингибирования были незначительными, но при этом наблюдалась задержка спороношения.

Последствие наблюдали через трое суток, антифунгальное воздействие уменьшалось, но задержка роста сохранялась до окончания опыта (10 суток).

Таким образом, эфирные масла *Lavandula angustifolia* и *Lavandula hybrida* угнетали рост всех исследуемых микромицетов: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Penicillium brevicompactum*, *P. raciborskii*, *Aspergillus ochraceus* и *A. niger*. Ингибирующее действие отдельного эфирного масла прямо пропорционально зависело от его количества в среде обитания микромицетов. Антифунгальная активность ослабевала при продолжении инкубации. Тестируемые микроорганизмы были в разной степени чувствительны к воздействию эфирных масел.

Насыщение фитоценозов ароматическими растениями способствует проявлению их фитосанитарных свойств, благоприятно влияет на среду обитания, улучшает рост и развитие других его компонентов.

ДЕЙСТВИЕ ФУНГИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

Гончарова И. А., Луговнева А. П., Воронкович Н. В., Балюта А. А.

Институт Микробиологии НАН Беларуси, Минск

При ликвидации очагов плесневого поражения и действиях по профилактике их появления обычно используется антисептическая обработка материалов составами, содержащими фунгициды. Современные антисептические составы на водной основе, сочетающие высокую эффективность с экологической безопасностью, как правило, основаны на соединениях органической природы: четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), производные гуанидина, изотиазолиноны и др. Однако в строительных организациях и жилищно-коммунальном хозяйстве до настоящего времени в качестве антисептика широко используют дешевый, но более опасный для здоровья сульфат меди (медный купорос). В то же время применение даже высокоактивных фунгицидов не всегда решает проблему. В тех случаях, когда причины повышенной влажности субстрата не были устранены за короткий период, антисептированные поверхности вновь колонизируются плесневыми грибами, при этом часто их рост интенсифицируется.

С целью изучения причин данного явления и поиска путей минимизации последствий было проведено сравнительное изучение роста микроскопических грибов рода *Aspergillus* на средах с медным купоросом, бензалкониум хлоридом (ЧАС), полигексаметиленгуанидином и препаратами на основе изотиазолинонов. Выявлено, что последние значительно превосходят другие исследованные классы биоцидных соединений по фунгицидной активности, но уступают им по стабильности.

В экспериментальной работе при изучении действия биоцидов на физиолого-биохимические свойства микроскопических грибов посевным материалом служат обычно споры. В то же время наибольшая интенсивность колонизации микромицетами строительных материалов возникает при распространении вегетативного мицелия из очагов плесневого поражения, содержащих легкодоступные источники питания, например, клеи. Получение гифальной биомассы, не содержащей спорового материала, обеспечивает глубинное культивирование грибов. Использование в качестве посевного материала вместо спор пеллет глубинного мицелия повысило устойчивость грибов ко всем фунгицидам примерно в равной мере.

По мере возрастания содержания биоцидов в среде увеличивался диаметр пеллет и повышалось удельное содержание фракции клеточных стенок в мицелии в стационарной фазе роста глубинной культуры. При добавлении биоцидов к растущей культуре часто происходила меланизация клеточных стенок, наиболее значительная на средах с медным купоросом. Сорбционная емкость меланизированной биомассы по отношению к ионам меди была значительно выше, чем у непигментированного мицелия. Возможно, это один из основных механизмов адаптации грибов к медьсодержащим соединениям.

Внесение в питательную среду бензалкониум хлорида приводило к значительному снижению рН культуральной жидкости по сравнению с контролем, что способствовало ослаблению токсичности фунгицида, активность которого наиболее высока в нейтральной и слабощелочной среде. В присутствии бензалкониум хлорида наблюдался также выброс во внешнюю среду аминокислот и белков. Добавление этих веществ в питательную среду повышало устойчивость грибов всем исследованным препаратам.

В связи с высокими адаптационными возможностями плесневых грибов при разработке мер по ликвидации очагов плесневого поражения необходимо учитывать длительность процесса, состав микобиоты, внешние условия, свойства материалов, а также химическую природу применявшихся ранее биозащитных средств.

БИОАКТИВНОСТЬ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ (НАНОАЛМАЗОВ) В КУЛЬТУРЕ МИКРОМИЦЕТОВ

Терехова В. А.^{1,2}, Вавилова В. М.², Кувичкина Т. Н.³, Решетиллов А. Н.³, Губаревич Т. М.⁴, Калачев А. А.⁵

¹ Институт проблем экологии и эволюции РАН, Москва

² Факультет почвоведения МГУ, Москва

³ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино

⁴ Институт физики НАН Беларуси, Минск

⁵ ПлазмаХим /PlasmaChem GmbH, Берлин

В настоящее время большое внимание уделяется изучению воздействия наночастиц на клетки человека, оценке безопасности наноматериалов в биомедицинских целях. Однако продукты и отходы нанотехнологий рано или поздно попадают в окружающую среду и могут инициировать негативные процессы в природных экосистемах, оказывая воздействие на организмы разных трофических уровней, включая представителей царства грибов. О реакции микромицетов на наночастицы известно крайне мало.

Цель данной работы заключалась в исследовании биологической активности широко используемых в промышленности углеродных наночастиц – наноалмазов (НА) в отношении микромицета *Fusarium oxysporum* Shlecht. (штамм Н-3-5 из коллекции Лаборатории экотоксикологического анализа почв ф-та почвоведения МГУ).

В работе исследованы частицы НА, полученные методом детонационного синтеза из мощных взрывчатых веществ (производство компании PlasmaChem GmbH, Germany www.plasmachem.com), отличающиеся размером частиц и степенью агрегированности. Исследовали биоактивность препаратов НА в концентрации 5–0,005 и 0,0005 %. Влияние суспензии НА на ростовые характеристики культуры фузариума изучали в колбах с жидкой средой Чапека (50 мл), изменение скорости роста и морфологии колоний - на Чапек-агаре в чашках Петри. Воздействие НА на физиологическую функцию проростков микроконидий фиксировали при помощи биосенсора на основе электрода Кларка по потреблению молекулярного кислорода при окислении глюкозы (биосенсор «МультиБио-01», ЗАО «Аналитик-ВНИПИМ», Россия).

Установлена зависимость степени токсичности НА по отношению к *F. oxysporum* от наличия и размеров агрегатов НА. Выявлено влияние размерного фактора частиц НА на ростовые характеристики микромицета. Показано, что более мелкие частицы (менее 10 нм) не образующие агрегаты, в большей степени подавляют накопление биомассы фузариума в жидкой среде. При иммобилизации НА в геле (агаризованной среде Чапека) этот эффект не столь заметен. При нанесении суспензии НА (0,2 мл) в концентрации более чем 0,5 % на поверхность агара в чашке Петри образуется своего рода защитная пленка, которая препятствует распространению грибной колонии на поверхности питательной среды. Этот эффект может представлять практический интерес для включения наноалмазов в защитные противогрибковые препараты. При воздействии суспензии НА (0,005%) на проростки микромицета *F. oxysporum* при введении 5мМ раствора глюкозы отмечено снижение ответа сенсора амперометрического типа как стационарных условиях, так и при перемешивании

Таким образом, изучение воздействия синтетических наноалмазов на развитие культуры микромицета *F. oxysporum* показало, что, несмотря на углеродную природу НА, придающую им определенное сродство к органическим элементам окружающей среды, в определенных концентрациях они оказывают токсическое действие.

УСТОЙЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФИТОФТОРОЗА И АЛЬТЕРНАРИОЗА КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТА К НЕКОТОРЫМ ФУНГИЦИДАМ

Еланский С.Н.¹, Побединская М.А.¹, Романова С.С.¹, Александрова А.В.¹, Пляхневич М.П.²

1 – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

2 – НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству, Самохваловичи

Фитофтороз и альтернариоз — наиболее опасные и экономически значимые заболевания картофеля и томата во многих странах мира. Основной метод борьбы с ними — химическая защита, заключающаяся в опрыскивании посадок фунгицидными препаратами. Для их эффективного действия в популяциях патогенов не должно быть высокой доли устойчивых штаммов.

Мы провели исследование устойчивости штаммов *Phytophthora infestans* из 6 удаленных регионов Европейской части России (Ленинградская, Московская, Астраханская, Костромская, Смоленская области, республика Марий Эл) и Беларуси к нескольким широко применяемым фунгицидам: системным металаксилу (препараты Метаксил, Ридомил Голд МЦ) и азоксистробину (Квадрис), трансламинарному диметоморфу (Акробат МЦ), контактными флуазинаму (Ширлан), хлороталонилом (Браво) и манкоцебу (Манкоцеб, Дитан М-45, Метаксил, Ридомил Голд МЦ, Акробат МЦ, Сектин Феномен). Азоксистробин имеет доказанную перекрестную устойчивость с другими стробилуриновыми фунгицидами, из которых в России зарегистрирован крезоксим-метил (Строби), а также с фамоксадоном (Танос) и фенамидоном (Сектин феномен).

Также изучали устойчивость возбудителей альтернариоза (*Alternaria solani*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*), выделенных в тех же регионах и на Дальнем востоке, к фунгицидам манкоцеб и дифеноконазол (Скор).

Оценку устойчивости изолятов проводили в чашках Петри на агаризованной среде с добавлением соответствующего фунгицида. Для каждого изолята определяли показатель EC_{50} , т.е. концентрацию фунгицида, необходимую для замедления скорости радиального роста колонии в 2 раза относительно контроля (среда без фунгицида).

Изучение устойчивости к манкоцебу показало, что во всех изученных популяциях преобладали чувствительные штаммы, показатель EC_{50} которых не превышал 10 мкг/мл. Наиболее устойчивые изоляты были отмечены в Беларуси и в Ленинградской области. Исследование устойчивости к манкоцебу не выявило штаммов с уровнем EC_{50} , превышающим 31 мкг/мл, хотя в нескольких популяциях были представлены штаммы с близкими к максимальному значениями EC_{50} . Возможно, это пороговое значение, и штаммы с более высокой устойчивостью оказываются неконкурентоспособны в агроценозах.

К хлороталонилу все исследованные изоляты были чувствительны, показатель EC_{50} не превышал 17 мкг/мл. Не было выявлено и изолятов, устойчивых к флуазинаму. Все исследованные российские штаммы имели показатель EC_{50} не превышающий 8,5 мкг/мл. В Беларуси были выявлены несколько штаммов с повышенной устойчивостью; самый устойчивый изолят имел $EC_{50}=22$ мкг/мл. Все проверенные изоляты были высокочувствительны к диметоморфу. Ни в России, ни в Беларуси не было выявлено изолятов с EC_{50} более 0,1 мкг/мл.

Повышение устойчивости к мультисайтовым фунгицидам происходит медленно, путем ступенчатого мутагенеза. По-видимому, обработка манкоцебом, флуазинамом, хлороталонилом и диметоморфом не ведет к образованию высокоустойчивых изолятов и не оказывает существенного влияния на состав популяций.

На устойчивость к моносайтовому азоксистробину были протестированы штаммы из всех изученных популяций. Все исследованные изоляты были высокочувствительными, их показатель EC_{50} не превышал 0,07 мкг/мл.

В большинстве регионов европейской части России с листьев картофеля и томата выделялись мелкоспоровые виды *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*. Крупноспоровый *A. solani* встречался значительно реже: он был обнаружен только в сборах из республики Марий Эл, Астраханской, Ленинградской областей и Приморского края.

Штаммы *A. solani* были наиболее восприимчивыми к манкоцебу. Среди них не было выявлено высокоустойчивых форм. Показатель EC_{50} варьировал в пределах 7,3 – 85,3 мкг/мл. В то же время все мелкоспоровые виды, напротив, отличались очень высокой вариабельностью устойчивости. Высокоустойчивые штаммы среди мелкоспоровых видов были отмечены почти во всех исследованных регионах, показатель EC_{50} варьировал от 24,1 до 391,3 мкг/мл у *A. infectoria*, от 7,4 до 582,3 мкг/мл у *A. tenuissima*, от 9,77 до 597,6 мкг/мл у *A. alternata*.

К дифеноконазолу штаммы всех исследованных видов были восприимчивы, показатель EC_{50} варьировал от 0,6 до 19,0 у *A. solani*, от 0,65 до 7,75 мкг/мл у *A. infectoria*, от 0,7 до 2,1 мкг/мл у *A. tenuissima*, от 0,63 до 16,8 мкг/мл у *A. alternata*.

Результаты проведенного исследования показывают, что самыми эффективными фунгицидами против *P. infestans* были азоксистробин и диметоморф. Хорошим эффектом обладали и контактные фунгициды хлороталонил, флуазинам и манкоцеб, их применение в рекомендованных дозах позволит успешно контролировать фитофтороз. К металаксилу в некоторых популяциях существует значительная доля высокоустойчивых штаммов. Контроль фитофтороза с помощью металаксил - содержащих препаратов в таких популяциях не принесет желаемых результатов.

Дифеноконазол показал высокую эффективность против всех видов грибов – возбудителей альтернариоза картофеля и томата. Манкоцеб был эффективен только против *A. solani*, его фунгицидный эффект по отношению к мелкоспоровым видам неудовлетворителен.