

УДК 579.24:616-002.828

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ Cu^{2+} НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *Aspergillus niger*

А.А. Баязитова, Н.И. Глушко, С.А. Лисовская, Е.В. Халдеева,
В.Р. Паршаков, О.Н. Ильинская

Аннотация

Статья посвящена анализу влияния тяжелых металлов на ферментативную активность грибов рода *Aspergillus niger*. Было исследовано влияние меди на скорость роста, устойчивость к антимикотикам, а также амилалитическую и липолитическую активность различных клинических штаммов *Aspergillus niger*. Показано что присутствие ионов меди снижает скорость роста и спорообразование клинических штаммов *Aspergillus niger*, частичное ингибирующее действие высоких концентраций солей меди на липолитическую активность. Установлено, что добавление в среду солей меди влияет на чувствительность клинических штаммов *Aspergillus niger* к противогрибковым препаратам, а также отмечена зависимость чувствительности микромицетов к антимикотическим препаратам от концентрации меди.

Ключевые слова: *Aspergillus niger*, липолитическая активность, амилалитическая активность, тяжелые металлы, медь.

Введение

За последние десятилетия грибковые инфекции стали важной проблемой здравоохранения во многих странах мира [1]. Ранее считавшиеся редкими возбудителями инфекционных заболеваний грибы рода *Aspergillus* сейчас являются важной причиной отягощения основного заболевания и смертности у больных с иммунодефицитами [2, 3]. На сегодняшний день инвазивный аспергиллез является частой причиной инфекционной смертности от пневмонии у пациентов, перенесших трансплантацию легких и других органов [3, 4]. Грибы рода *Aspergillus* также могут вызывать широкий диапазон хронических, сапрофитных и аллергических состояний, в том числе отомикозы.

Грибы рода *Aspergillus* отличаются многообразной биохимической активностью. Они вырабатывают разнообразные амилалитические, протеолитические, липолитические ферменты, разрушающие роговое покрытие, хитин и т. д., что способствует заселению ими самых разнообразных органических и неорганических субстратов и активной колонизации живых организмов. Помимо различных ферментов, органических кислот и антибиотиков, некоторые виды могут образовывать яды – микотоксины, оказывающие патологическое действие на организм человека, животных.

Для роста и развития плесневых грибов требуется присутствие в окружающей среде определенных питательных веществ, в том числе макро- и микроэлементов, в частности солей меди [5]. Медь принадлежит к числу необходимых

грибу микроэлементов. Она входит в состав таких оксидаз, как лакказа (полифенолоксидаза), оксидаза аскорбиновой кислоты, оксидаза цитохрома а₃, уратоксидаза, и участвует в этапах восстановления нитратов [6].

Хорошо известно, что темноокрашенные грибы, к которым относятся микромицеты рода *Aspergillus niger*, относительно устойчивы к действию тяжелых металлов и способны к их накоплению. Так, в местах повышенного загрязнения, в частности в придорожных зонах, отмечается увеличение содержания темноокрашенных меланинсодержащих грибов, к которым также относятся микромицеты рода *Aspergillus* [7]. В то же время накопление тяжелых металлов может приводить к угнетению и даже к гибели чувствительных микроорганизмов или, наоборот, стимулировать развитие устойчивых видов, оказывая влияние на численность микроорганизмов в почве [8, 9], однако механизм такого воздействия до сих пор не ясен.

Целью настоящей работы было изучение влияния меди на скорость роста, устойчивость к антимикотикам, а также амилалитическую и липолитическую активность клинических штаммов *Aspergillus niger*.

1. Материалы и методы

В работе использовали семь штаммов *Aspergillus niger*: 3413, 3415, 3376, 3411, УК-1, УК-2, УК-3. Все культуры данных микромицетов, использованных в работе, имели клиническое происхождение и были получены в Казанском НИИ эпидемиологии и микробиологии (г. Казань) в соответствии с согласием пациентов (протокол № 2 от 05.03.2014 г.). Штаммы УК-1, УК-2, УК-3 были выделены от больных отомикозами, штаммы 3413, 3415, 3376, 3411 – от больных дерматитами.

Забор клинического материала производили при помощи стерильного ватного тампона с последующим смывом стерильной дистиллированной водой. Посев смыва проводился на агаризованную среду Чапека и модифицированную среду Сабуро. После выделения возбудителя проводили выделение чистой культуры.

Исследование проводили методом культивирования на чашках с модифицированной средой Сабуро с добавлением 1 мл 1 М, 0.5 М и 0.1 М растворов CuSO₄ на поверхность питательной среды. После пропитывания среды солями тяжелых металлов производили посев штаммов *Aspergillus niger*. Плесневые грибы выращивали при 30 °С в течение 3 сут.

Липолитическая активность *A. niger* оценивалась в тесте на гидролиз эфиров жирных кислот по методу Бузoleвой и др. [10] с предложенными нами изменениями, касающимися биологических потребностей грибов рода *Aspergillus*. Исследуемые штаммы, выращенные на средах с повышенным содержанием солей тяжелых металлов, пересеивали на агаризованную среду с добавлением к нему гидратированного CaCl₂. В качестве источника углерода использовали твин-20. Засеянные чашки Петри выдерживали при 30 °С в течение 3 сут.

Для выявления амилалитической активности использовали агаризованную среду с добавлением растворимого крахмала и KН₂РO₄ [11]. Среду для определения амилалитической активности засеивали исследуемыми штаммами *Aspergillus niger*, выращенными на средах с повышенным содержанием ионов

CuSO_4 . Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивалась в синий цвет, если крахмал гидролизировался до декстринов. Зону гидролиза крахмала измеряли в миллиметрах от края колонии до границы светлой зоны. Чем больше размер светлой зоны, тем выше амилалитическая активность.

Исследование антимикотической активности проводили диско-диффузным методом на чашках с модифицированной средой Сабуро. На поверхность питательной среды наносили исследуемую культуру и затем помещали диски (расширенный набор дисков для определения чувствительности к противогрибковым препаратам, набор 24), содержащие определенное количество антимикотика. Гифомицеты выращивали при 30 °C в течение 5 сут. Результаты оценивали по зоне подавления роста микромицетов вокруг диска.

Полученные в работе результаты подвергали статистической обработке по общепринятым методикам с помощью стандартной программы Microsoft Excel 2010. Статистическая обработка данных включала: определение средних величин показателей (M), вычисление значений квадратичного отклонения (SD), доверительного интервала, выявление достоверности различий средних значений показателей в сравниваемых группах с использованием критерия Фишера (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% – $p < 0.05$).

2. Результаты

Установлено, что низкие концентрации меди не влияют на рост изученных штаммов (рис. 1). В то же время при добавлении 1 мл 1 М и 1 мл 0.5 М раствора CuSO_4 отмечался слабый рост *Aspergillus niger*. Добавление 1 мл 0.1 М раствора CuSO_4 также приводило к ослаблению четырех штаммов (УК-1, УК-3, 3411 и 3415). У двух штаммов *A. niger* (3376 и УК-3) наблюдалось полное ингибирование роста при добавлении 1 мл 1 М раствора CuSO_4 .

При добавлении 1 мл 1 М и 1 мл 0.5 М раствора CuSO_4 спорообразование также практически прекращалось у всех штаммов, при этом у всех штаммов спорангии существенно уменьшались в размерах. Изменение размера спорангиев в контрольных чашках не отмечалось.

В ходе проведенных исследований установлено, что высокие концентрации ионов меди оказывают влияние на липолитическую активность (рис. 2). Так, полное ингибирование липолитической активности отмечалось лишь при добавлении 1 мл 1 М CuSO_4 в чашку Петри с исследуемой культурой. При добавлении меньшей концентрации (1 мл 0.1 М и 1 мл 0.5 М) раствора CuSO_4 отмечено усиление липолитической активности двух штаммов 3413, 3415 и ингибирование липолитической активности штамма УК-3. В остальных случаях влияние на липолитическую активность не наблюдалось.

При добавлении 1 мл 1 М CuSO_4 липолитическая активность сохранялась лишь у трех штаммов *A. niger*: 3411, 3413, УК-2.

В контрольной группе, выращенной на среде без добавления солей меди, липолитическая активность наблюдалась у всех штаммов.

Амилалитическая активность большинства изученных штаммов выражена умеренно, хотя для двух штаммов отмечены более высокие значения (рис. 3). При добавлении 1 мл 1 М и 1 мл 0.5 М раствора CuSO_4 у двух штаммов 3411

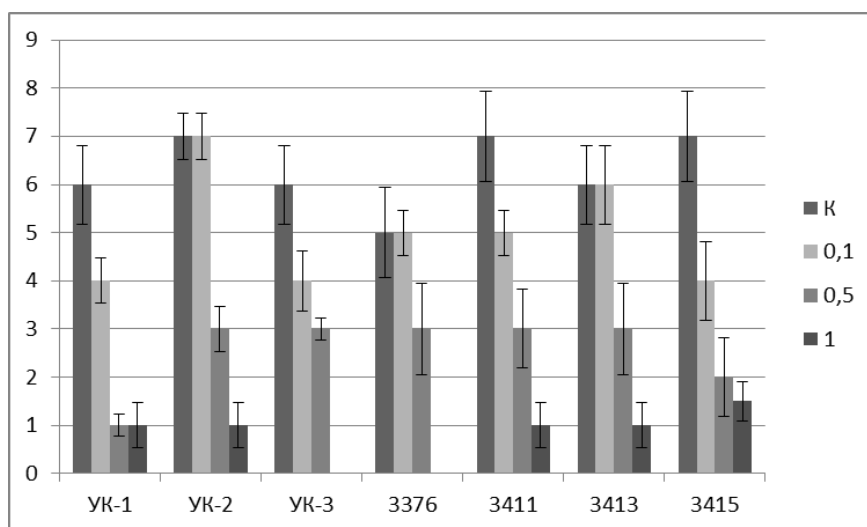


Рис. 1. Рост штаммов *Aspergillus niger*, выделенных от больных, на модифицированной среде Сабуро с добавлением Cu^{2+} на третий день роста, см

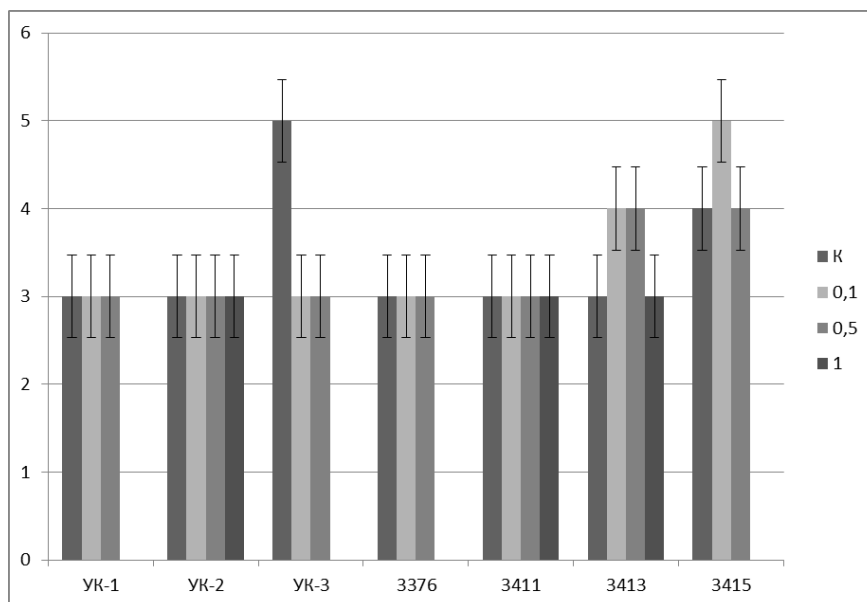


Рис. 2. Липолитическая активность клинических штаммов *A. niger* при добавлении ионов меди

и 3413 наблюдалось незначительное усиление амилалитической активности. В остальных случаях влияния ионов меди на амилалитическую активность не обнаружено.

В ходе проведенных исследований было установлено, что ионы меди могут оказывать влияние на степень чувствительности *Aspergillus niger* к антимикотическим препаратам (табл. 1).

Изначально все клинические штаммы обладали чувствительностью к тербинафину и были устойчивы к флуконазолу.

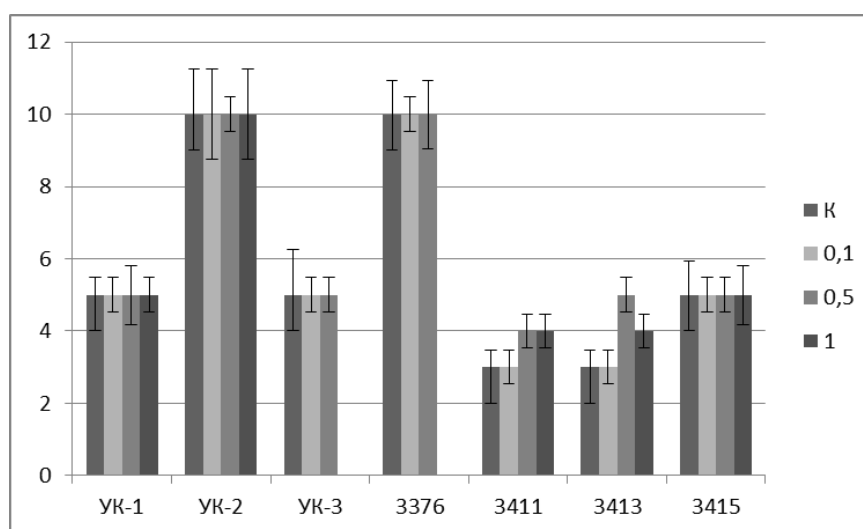


Рис. 3. Амилолитическая активность клинических штаммов *A. niger* при добавлении ионов меди

Табл. 1

Чувствительность штаммов *Aspergillus niger*, выращенных на среде с добавлением ионов Cu^{2+} , к антимикотикам, мм. Изменения признаков статистически значимы ($F_{\text{опыт}} > F_{\text{табл}}$, $p < 0.05$)

		УК-1	УК-2	УК-3	3376	3411	3413	3415
Тербинафин	К	15 ± 0.8	10 ± 0.4	10 ± 0.8	10 ± 0.4	10 ± 0.4	10 ± 0.4	10 ± 0.4
	0.1	11 ± 0.4	20 ± 0.8	10 ± 0.4	15 ± 0.8	30 ± 0.8	20 ± 0.4	15 ± 0.8
	0.5	15 ± 0.4	20 ± 0.4	30 ± 0.4	13 ± 1.0	30 ± 0.4	20 ± 0.4	20 ± 0.4
	1	12 ± 0.8	20 ± 1.0	Нет роста	Нет роста	30 ± 0.4	20 ± 0.8	20 ± 1.2
Флуконазол	К	–	–	–	–	–	–	–
	0.1	–	70 ± 2.5	–	–	–	–	–
	0.5	–	30 ± 1.5	–	–	–	–	–
	1	–	20 ± 1.4	Нет роста	Нет роста	–	–	–

Под действием ионов меди было отмечено небольшое снижение чувствительности к тербинафину штамма УК-1. В остальных случаях добавление CuSO_4 в питательную среду приводило к тому, что чувствительность к препарату увеличивалась. Диаметр зоны лизиса при этом увеличивался в 1.5–2 раза. Высокие концентрации металла негативно влияли на рост некоторых штаммов. Так, наблюдалось полное ингибирование роста двух штаммов *A. niger* (3376 и УК-3) на среде с 1 мл 1 М раствора CuSO_4 .

Следует отметить, что штаммы, выделенные с кожи, отличались более высокой чувствительностью к тербинафину при добавлении в среду CuSO_4 .

Все исследуемые штаммы были резистентны к действию флуконазола, однако при добавлении в среду 1 мл 0.1 М раствора CuSO_4 у штамма УК-2 появлялась чувствительность к флуконазолу, но при увеличении концентрации солей меди в среде чувствительность к антимикотику снижалась.

Выводы

Нами установлено, что присутствие ионов меди снижает скорость роста и спорообразование клинических штаммов *Aspergillus niger*. Отмечено также, что при высоких концентрациях ионы Cu^{2+} могут оказывать ингибирующее действие на липолитическую активность. Кроме этого, присутствие солей меди незначительно сказывается на аμιолитической активности некоторых штаммов *Aspergillus niger*. Существует ограниченное число данных, свидетельствующих об ингибирующем действии ионов меди на жизнеспособность грибов рода *Aspergillus*. Наши результаты подтверждают имеющиеся в литературе сведения о том, что медь может являться перспективным агентом для создания новых антимикотических препаратов.

Показано, что добавление в среду солей меди влияет на чувствительность клинических штаммов *Aspergillus niger* к противогрибковым препаратам. Установлены прямая пропорциональная зависимость чувствительности микромицетов к тербинафину от концентрации меди и обратная пропорциональная зависимость к флуконазолу. Полученные данные позволили предположить, что тяжелые металлы воздействуют на процесс синтеза эргостерола, возможно, за счет влияния на сквален-эпоксидазу. Вероятно также, что тяжелые металлы оказывают влияние на раннюю стадию синтеза стерина в клетках микромицетов. Данный процесс требует более детального изучения.

Литература

1. Аравийский Р.А., Васильева Н.В., Климко Н.Н. Диагностика микозов. – СПб.: Изд. дом СПбМАПО, 2004. – 186 с.
2. Patterson T.F., Kirkpatrick W.R., White M., Hiemenz J.W., Wingard J.R., Dupont B., Rinaldi M.G., Stevens D.A., Graybill J.R. Invasive aspergillosis: Disease spectrum, treatment practices, and outcomes // *Medicine (Baltimore)*. – 2000. – V. 79, No 4. – P. 250–260.
3. Walsh T.J., Anaissie E.J., Denning D.W., Herbrecht R., Kontoyiannis D.P., Marr K.A., Morrison V.A., Segal B.H., Steinbach W.J., Stevens D.A., van Burik J.A., Wingard J.R., Patterson T.F. Treatment of aspergillosis: Clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – V. 46, No 3. – P. 327–360. – doi: 10.1086/525258.
4. Grow W.B., Moreb J.S., Roque D., Manion K., Leather H., Reddy V., Khan S.A., Finiewicz K.J., Nguyen H., Clancy C.J., Mehta P.S., Wingard J.R. Late onset of invasive aspergillus infection in bone marrow transplant patients at a university hospital // *Bone Marrow Transplant.* – 2002. – V. 29, No 1. – P. 15–19.
5. Бузолева Л.С., Кривошеева А.М. Влияние тяжелых металлов на размножение патогенных бактерий // *Усп. соврем. естествознания*. – 2013. – № 7. – С. 30–33.
6. Winkelmann G., Winge D.R. (Eds.) *Metal Ions in Fungi*. – CRC Press, 1994. – 528 p.
7. Марфенина О.Е., Фомичева Г.М. Потенциально патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции // *Успехи медицинской микологии*. Т. 1 / Под ред. Ю.В. Сергеева. – М.: Нац. акад. микологии, 2007. – С. 235–266.
8. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов. – М.: Медицина для всех, 2005. – 196 с.

9. Левин С.В., Гузев В.С., Асеева И.В., Бабьева И.П., Марфенина О.Е., Умаров М.М. Тяжелые металлы как фактор антропогенного воздействия на почвенную микробиоту // Микроорганизмы и охрана почв. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – С. 5–46.
10. Бузалева Л.С. Пручкина З.В. Метод определения липазы бактерий кишечной группы // Лабораторное дело. – 1990. – № 12. – С. 74–75.
11. Билай В. Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наукова думка, 1982. – 552 с.

Поступила в редакцию
29.01.15

Баязитова Алина Ахметовна – старший лаборант, Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии; аспирант кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: alien2110@gmail.com

Халдеева Елена Владимировна – кандидат химических наук, заведующий лабораторией микологии, Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия.

E-mail: mycology-kazan@yandex.ru

Глушко Надежда Ивановна – старший научный сотрудник, Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия.

Лисовская Светлана Анатольевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия.

Паршаков Вениамин Романович – младший научный сотрудник, Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, г. Казань, Россия.

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru

* * *

THE INFLUENCE OF Cu^{2+} SALTS ON THE ENZYMATIC ACTIVITY OF *Aspergillus niger* CLINICAL ISOLATES

A.A. Bayazitova, N.I. Glushko, S.A. Lisovskaya, E.V. Khaldeeva,
V.R. Parshakov, O.N. Ilinskaya

Abstract

The influence of heavy metals on the enzymatic activity of *Aspergillus niger* is analyzed. The effects of Cu^{2+} on the growth rate, antimycotic resistance, as well as amylolytic and lipolytic activity of various clinical isolates of *Aspergillus niger* are studied. The obtained results show that Cu^{2+} reduces the growth rate and sporogenesis of the clinical isolates of *Aspergillus niger*. Partial inhibition of the lipolytic activity by the high concentrations of Cu^{2+} salts is found. Addition of Cu^{2+} salts to the medium affects the susceptibility of the clinical isolates of *Aspergillus niger* to antimycotic drugs. The dependence of the susceptibility of micromycetes to antimycotic drugs on the concentration of Cu^{2+} is emphasized.

Keywords: *Aspergillus niger*, lipolytic activity, amylolytic activity, heavy metals, cupric copper.

References

1. Araviiskii R.A., Vasil'eva N.V., Klimko N.N. Mycology diagnostics. St. Petersburg, Izd. SPbMAPO, 2004. 186 p. (In Russian)

2. Patterson T.F., Kirkpatrick W.R., White M., Hiemenz J.W., Wingard J.R., Dupont B., Rinaldi M.G., Stevens D.A., Graybill J.R. Invasive aspergillosis: disease spectrum, treatment practices, and outcomes. *Medicine (Baltimore)*, 2000, vol. 79, no. 4, pp. 250–260.
3. Walsh T.J., Anaissie E.J., Denning D.W., Herbrecht R., Kontoyiannis D.P., Marr K.A., Morrison V.A., Segal B.H., Steinbach W.J., Stevens D.A., van Burik J.A., Wingard J.R., Patterson T.F. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, vol. 46, no. 3, pp. 327–360. doi: 10.1086/525258.
4. Grow W.B., Moreb J.S., Roque D., Manion K., Leather H., Reddy V., Khan S.A., Finiewicz K.J., Nguyen H., Clancy C.J., Mehta P.S., Wingard J.R. Late onset of invasive aspergillus infection in bone marrow transplant patients at a university hospital. *Bone Marrow Transplant.*, 2002, vol. 29, no. 1, pp. 15–19.
5. Byzoleva L.S., Krivosheeva A.M. The effects of heavy metals on bacterial pathogens. *Usp. Sovrem. Estestvozn.*, 2013, no. 7, pp. 30–33. (In Russian)
6. Winkelmann G., Winge D.R. (Eds.) *Metal Ions in Fungi*. CRC Press, 1994. 528 p.
7. Marfenina O.E., Fomicheva G.M. Potentially pathogenic filamentous fungi in human environment. Modern tendencies. *Uspekhi meditsinskoj mikologii* [Advances in Medical Mycology]. Vol. 1. Sergeev Yu.V. (Ed.). Moscow, Nats. Akad. Mikol., 2007, pp. 235–266. (In Russian)
8. Marfenina O.E., *Antropogenic Ecology of Soil Bacteria*. Moscow, Meditsina dlya vsekh, 2005. 196 p. (In Russian)
9. Levin S.V., Guzeev V.S., Aseeva I.V., Bab'eva I.P., Marfenina O.E., Umarov M.M. Heavy metals as a factor of anthropogenic impact on soil microbiota. *Mikroorganizmy i okhrana pochv* [Microorganisms and soil protection]. Moscow, Izd. Mosk. Univ., 1989, pp. 5–46. (In Russian)
10. Byzoleva L.S., Pruchkina Z.V. Methods for identification lipase in coliform bacteria. *Lab. Delo*, 1990, no. 12, pp. 74–75. (In Russian)
11. Bilai V. *Methods of Experimental Mycology*. Kiev, Naukova dumka, 1982. 552 p. (In Russian)

Received
January 29, 2015

Bayazitova Alina Akhmetovna – Laboratory Assistant, Kazan Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia; PhD Student, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: alien2110@gmail.com

Khaldeeva Elena Vladimirovna – PhD in Chemistry, Head of the Laboratory of Mycology, Kazan Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia.

E-mail: mycology-kazan@yandex.ru

Glushko Nadezhda Ivanovna – Senior Research Fellow, Kazan Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia.

Lisovskaya Svetlana Anatol'evna – PhD in Biology, Leading Research Fellow, Kazan Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia.

Parshakov Veniamin Romanovich – Junior Research Fellow, Kazan Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia.

Ilinskaya Olga Nikolaevna – Doctor of Biology, Professor, Head of the Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru