

Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 130-летию С.Сейфуллина = С.Сейфуллиннің 130 жылдығына арналған халықаралық ғылыми -практикалық конференциясының материалдары. - 2024. – Ч.І.- С.83-87

УДК 57.017

## **БИОХИМИЧЕСКИЕ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРИБОВ ASPERGILLUS SPP. – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ**

*Байлина Г.Е., докторант  
Несипбаева А.Е., магистрант  
Кухар Е.В., доктор биологических наук, профессор  
Казахский агротехнический исследовательский университет имени  
С.Сейфуллина  
г.Астана*

*Смагулова А.М.  
Национальный центр биотехнологии  
г. Астана*

*Глотова Т.И.  
Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий  
Российской академии наук (СФНЦА РАН)  
Российская Федерация, Новосибирская область, п. Краснообск*

За последние несколько десятилетий грибковые инфекции, возбудителями которых являются сапрофитные или условно-патогенные грибы, называют оппортунистическими микозами. Оппортунистические микозы могут встречаться у сельскохозяйственных, диких, экзотических холонокровных животных (рептилий) [1].

Оппортунистические грибы, потенциальные патогены, которые при определенных условиях могут вызывать заболевания. Этому способствуют биологические особенности грибов – гифальная форма роста, обеспечивающая широкий контакт со средой, активный метаболизм, высокий уровень адаптации к условиям среды, способность к сапрофитному и паразитическому образу жизни. Возбудителями считаются дрожжевые грибы родов *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, недерматофитные («плесневые») гифомицеты родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Scopulariopsis* и др. Патогенность носит «оппортунистический» характер, т.е. проявляется при

снижении защитных факторов организма. В норме эти грибы являются комменсалами или контаминантами кожного покрова.

Авторы Elad D., Segal E. (2018) проводили поверхностное культивирование штамма *Aspergillus* RCAM 0135, который продуцирует протеолитические ферменты [2].

Потенциальная патогенность грибов обуславливается их свойствами адаптационного характера, позволяющими им противостоять защитным механизмам организма и осуществлять инвазию. К ним относятся экстрацеллюлярная секреция гидролитических ферментов протеаз. Существуют определенные ферменты, играющие важную роль в прогрессировании патогенеза условно-патогенных грибов [3].

Учитывая их роль в вирулентности микромицетов, интерес представляет изучение данных свойств возбудителей оппортунистических микозов.

Исследование проводилось в рамках проекта AP23489001 «Генетический мониторинг и анализ патогенности новых возбудителей оппортунистических микозов сельскохозяйственных животных в Казахстане», 2024-2026 гг.

Целью нашей работы являлось изучение биохимических и протеолитических свойств оппортунистических грибов, как потенциальных возбудителей микозов кожи животных.

Материалы и методы. Для исследований использовались следующие питательные среды: декстрозный агар Сабуро (65,5 г/л) – для культивирования грибов, среда из обезжиренного молока, желатин питательный (128 г/л) – для анализа на протеолитическую активность, среды Гисса (21 г/л) и Кристенсена (24 г/л) – для выявления сахаролитической и уреазной активности. Использовался метод прямых чашек, для этого кусочки шерсти, чешуек кожи были зафиксированы на поверхности питательной среды декстрозный агар Сабуро стерильным пинцетом. Затем чашки Петри инкубировали при температуре 28 °С. Культуры проверяли ежедневно в течение 10 дней.

Идентификацию полученных культур проводили с учетом роста колоний и по морфологическим признакам. В работе использовали «Определитель патогенных и условно-патогенных грибов» (пер. с англ.: Саттон Д., Фоторгилл А., Ринальди М., 2001 г.) [4].

#### Определение биохимических свойств

Для изучения биохимических свойств использовали стандартные среды Гисса с сахарозой, глюкозой, лактозой, мальтозой и маннитом, которые готовили по стандартной методике. Затем делали посев культур в пробирки со средами методом укола, инкубировали в термостате при 28°С под ежедневным контролем. Контроль включал проверку изменений цвета, мутности, газообразования. Изменения, происходившие при культивировании культур, оценивали визуально, интенсивность реакции

выражали в крестах (от «+» до «++++»). Среду Кристенсена использовали для определения уреазной активности, что помогало оценить способность грибов разлагать мочевины до аммиака.

#### Определение активности протеазы

Протеолитическую активность исследовали для выделенных грибов с использованием среды из обезжиренного молока. Пробирки с обезжиренным молоком были подготовлены и инокулированы с края чистых культур грибов. Пробирки инкубировали при 28°C, и через 7 дней наблюдали и фиксировали пептонизацию молока. Желатин питательный также использовали для выявления протеолитической активности на основании разжижения желатина. Пробирки со средой были подготовлены и инокулированы с края чистых культур грибов. Пробирки инкубировали при 28°C в течение 10 дней. Затем исследуемые культуры поместили в холодильник вместе с незасеянной контрольной пробиркой с питательным желатином. Затвердевание желатина проверяли путем переворачивания пробирок сразу после затвердевания контрольной пробирки. Выявление протеолиза: при положительном результате среда оставалась жидкой.

Результаты. Выделение чистой культуры грибов проводили на декстрозном агаре Сабуро. Всего было получено 14 изолятов *Aspergillus spp.*, выделенных от КРС–4 изолята, из них 2 – *Aspergillus flavus*, 2 – *Aspergillus terreus*. От лошадей выделено 10 изолятов, в том числе, 6 – *Aspergillus nidulans*, 4 – *Aspergillus terreus*.

При поверхностном культивировании сформировавшиеся колонии чистых культур грибов отличались по морфологическим признакам (рисунок 1).

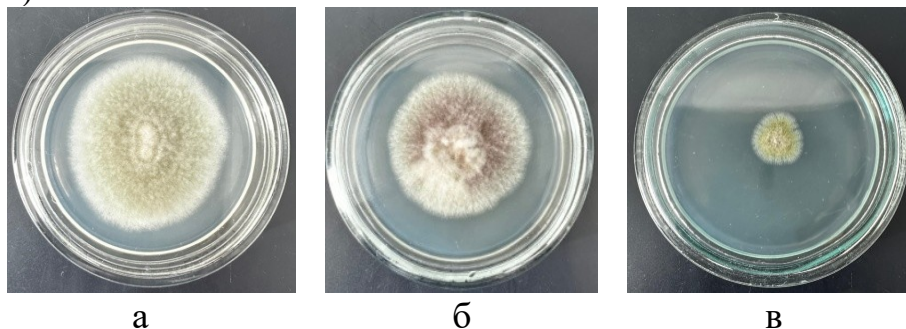


Рисунок 1 - Культуры грибов: а – *A. flavus* проба №3.20.3 Л, б – *A. terreus* проба №3.20.4.1 Л, в – *A. nidulans* проба №3.20.2 КРС

На рисунке 1 показаны чистые культуры разных штаммов *Aspergillus spp.* Изолят *A. flavus* №3.20.3 Л на плотной среде образует светло-зеленые бархатистые колонии, покрытые белым воздушным мицелием. Штамм *A. terreus* №3.20.4.1 Л растет равномерно в виде пушистого серо-белого мицелия, местами коричневые, края ровные, поверхность пушистая. Колонии культуры *A. nidulans* №3.20.2 КРС круглые пушистые с

нитевидным мицелием по краям колонии. Колония по центру белая, по периферии зеленая.

В дальнейшем проводилось микроскопическое исследование мазков с красителем – метиленовым синим (рис. 2).

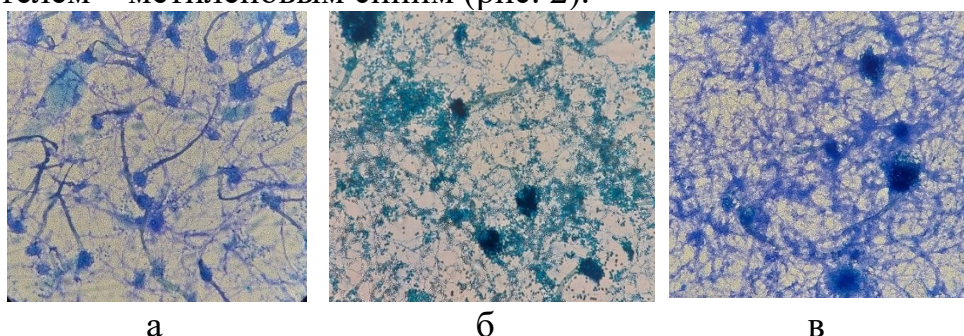


Рисунок 2 - Результаты микроскопии с красителем метиленовым синим:

а – *A. flavus* №3.20.3 Л, б – *A. terreus* №3.20.4.1 Л, в – *A. nidulans* №3.20.2 КРС

На рисунке 2в видно, что метиленовый синий окрасил все структуры гриба. Видны конидиеносцы с булавовидным вздутием на концах, при этом конидии отчетливо выделяются на фоне нитевидного мицелия. Рисунок 2б показывает короткие одноклеточные конидиеносцы с густо образованными конидиями, наблюдается обильное скопление спор. Мицелий тонкий, несептированный или слабо септированный. На рисунке 2в виден ветвящийся, тонкий мицелий. Конидиеносцы расположены одиночно, видны конидии, расположенные на верхнем конце.

Сахаролитическая активность изолятов *Aspergillus spp.* на средах Гисса представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты сахаролитической активности изолятов *Aspergillus spp.*

Изолят	Сахароза	Мальтоза	Глюкоза	Лактоза	Маннит
2.23.2.2 КРС	1	2	1	1	2
9.23.6 Л	3	1	1	1	2
3.20.1 Л	0	3	0	0	0
3.20.3.1 Л	4	0	4	2	2
3.20.4 Л	2	4	1	3	4
3.20.6 Л	1	1	2	2	2
3.20.9 Л	4	2	1	0	2
9.23.7 КРС	0	4	3	3	1
3.20.2.2 Л	4	2	1	1	3
3.20.2КРС	1	4	0	0	1

3.20.3Л	4	3	1	2	4
3.20.4.1 КРС	3	1	1	3	4
3.20.8 Л	1	1	0	3	4

Согласно таблице 1, выраженная активность к сахарозе имеется у 42% изолятов, к мальтозе и манниту – у 35,7%, к лактозе – у 28,5%, к глюкозе – у 14,2% штаммов.

На среде Кристенсена выявляли уреазную активность изолятов *Aspergillus* spp. Большинство изолятов 78,5% расщепляют мочевины, не имеют уреазной активности 21,5%.

Результаты теста на протеолитическую активность изолятов *Aspergillus* spp. представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты протеолитической активности изолятов *Aspergillus* spp

Изолят	Молоко	Желатин
2.23.2.2 КРС	положительный	положительный
9.23.6 Л	отрицательный	положительный
3.20.1 Л	положительный	положительный
3.20.3.1 Л	положительный	положительный
3.20.4 Л	положительный	отрицательный
3.20.6 Л	положительный	положительный
3.20.9 Л	положительный	положительный
9.23.7 КРС	положительный	отрицательный
3.20.2.2 Л	положительный	отрицательный
3.20.2КРС	положительный	отрицательный
3.20.3Л	положительный	положительный
3.20.4.1 КРС	положительный	положительный
3.20.8 Л	положительный	положительный

Анализ на протеолитическую активность изолятов показал, что почти у всех изолятов фиксировали пептонизацию молока, кроме одного штамма 9.23.6 Л. Протеолиз выявили у 71,4% изолятов, отрицательный у 28,6%.

Таким образом, было изучено 14 изолятов *Aspergillus* spp., из них выделенных от КРС–4:2 – *Aspergillus flavus*, 2 – *Aspergillus terreus*. Выявленные от лошадей изоляты в количестве 10 шт, включали 6 – *Aspergillus nidulans*, 4 – *Aspergillus terreus*.

Выявлена выраженная сахаролитическая активность изолятов к сахарозе у 42% изолятов, к мальтозе и манниту у 35,7%. Большинство изолятов 78,5% имеют уреазную активность. Протеолитическая

активность выявлена почти у всех изолятов *Aspergillus spp.* на среде с питательным желатином и средой с обезжиренным молоком.

#### Список литературы

- 1 Елинов, НП, Васильева, НВ, Разнатовский, КИ. (2018). Дерматомикозы или поверхностные микозы кожи и её придатков – волос и ногтей. Лабораторная диагностика. *Проблемы медицинской микологии*, 10(1), 27-34.
- 2 Elad, D., Segal E. (2018). Diagnostic Aspects of Veterinary and Human Aspergillosis. *Front Microbiol.*, 21:9(1303). doi:10.3389/fmicb.2018.01303
- 3 Kumari, A., Tripathi, AN, Upadhyay, SK, Gupta, TM, Prakash, PY. (2024). *Chapter 13 - Enzymes conferring virulence traits among human pathogenic fungi.* Enzyme Biotechnology for Environmental Sustainability. Progress in Biochemistry and Biotechnology, 339-362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-22072-2.00001-2>
- 4 Саттон, Д., Фотергилл, А., Ринальди, М., Саттон, Д. (2021). *Определитель патогенных и условно патогенных грибов.* Москва Мир.