

Исследование антимикоплазменной активности культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 — продуцента противоопухолевого и антивирусного фермента L-лизин- α -оксидазы

И. П. СМЕРНОВА¹, И. В. РАКОВСКАЯ²

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

² ФГБУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

Antimycoplasmic Activity of Fermentation Broth of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180, an Organism Producing L-Lysine- α -Oxidase, an Antitumor and Antiviral Enzyme

I. P. SMIRNOVA, I. V. RAKOVSKAYA

Russian University of Peoples' Friendship, Moscow

N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Получен концентрат культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 — продуцента противоопухолевого и антивирусного фермента L-лизин- α -оксидазы с активностью в культуральной жидкости 0,54-0,56 Ед/мл. Впервые исследовано влияние полученного концентрата на рост микоплазм: двух видов представителей семейства Mycoplasmataceae: *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma fermentans* и одного вида представителя семейства Aholoplasmataceae: *Aholeplasma laidlawii*. Показано, что культуральная жидкость *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 — продуцента противоопухолевого и антивирусного фермента L-лизин- α -оксидазы ингибирует рост *Mycoplasma hominis* после предварительного контакта. Степень подавления роста зависит от посевной дозы микоплазмы и исследованной концентрации культуральной жидкости триходермы.

Ключевые слова: L-лизин- α -оксидаза, триходерма, микоплазмы.

A concentrate of the fermentation broth of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180, an organism producing L-lysine- α -oxidase, an antitumor and antiviral enzyme, with the activity in the fermentation broth of 0.54-0.56 U/ml was recovered. The effect of the concentrate on the mycoplasmas growth was investigated for the first time. Two representatives of Mycoplasmataceae, i.e. *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and one representative of Aholoplasmataceae, i. e. *Aholeplasma laidlawii* were used. It was shown that the fermentation broth inhibited the growth of *Mycoplasma hominis* after the preliminary exposure. The inhibition rate depended on the mycoplasma inoculation dose and the fermentation broth concentration.

Key words: L-lysine- α -oxidase, trichoderma, mycoplasmas.

Микоплазмы относятся к классу Mollicutes, который включает несколько семейств и в том числе семейства Mycoplasmataceae и Aholoplasmataceae. В организме человека микоплазмы обитают на влажных мукозных поверхностях и при определённых условиях могут вызывать заболевания респираторного и урогенитального трактов. Они способны длительно персистировать в организме хозяина, так как обладают большим количеством свойств и факторов, способствующих ускользанию от иммунного надзора хозяина. Инфекционный процесс, вызванный микоплазмами, имеет, как правило, генерализованный характер [1].

Для лечения микоплазменных инфекций используют антибиотики широкого спектра дейст-

вия: чаще всего антибиотики тетрациклинового ряда (доксциклин, миноциклин) и макролиды (джозамицин, клиндамицин, мидекамицин, рокситромицин). Однако известно, что многие штаммы микоплазм, обитающие в урогенитальном тракте, резистентны к тетрациклинам и макролидам. В таких случаях рекомендуется использовать хинолоны: левофлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин, ципрофлоксацин. Но в настоящее время от пациентов выделяют штаммы, устойчивые и к хинолонам. Показано также, что эффективность антибиотиков зависит от состояния иммунной системы. Для пациентов с иммунодефицитом рекомендуют вводить антибиотики внутривенно и обязательно после определения чувствительности к ним выделенной микоплазмы. Часто требуется продолжительная терапия. В связи с этим ведущие микоплазмологи считают,

© И. П. Смирнова, И. В. Раковская, 2014

Адрес для корреспонденции: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. РУДН

что радикальных средств для лечения микоплазменных инфекций в настоящее время нет [2].

Ранее нами была доказана термостабильность культуральной жидкости штамма-продуцента L-лизин- α -оксидазы и вследствие этого у нас появилась возможность осуществить предварительные испытания её на некоторые штаммы микоплазм [3—5].

M. hominis является условно-патогенным микроорганизмом, обитает в урогенитальном тракте (УГТ) человека, причастна, по данным ряда авторов, к развитию хориоамнионита, внутриутробной патологии плода, развитию бактериального вагиноза и других патологических состояний УГТ. Описаны случаи выделения этой микоплазмы при абсцессе головного мозга, при пневмонии, при перикардите, эндокардите, раневой инфекции [1].

M. fermentans также является условно-патогенным микроорганизмом.

Её выделяют из УГТ человека, а также из верхних дыхательных путей при фарингите.

A. laidlawii — сапрофит, впервые была выделена из сточных вод. Этот микроорганизм выделяют с растений, из почвы, из различных клинических образцов от крупного рогатого скота, свиней, птиц и человека.

M. fermentans и *A. laidlawii* являются частым контаминантом клеточных культур различного происхождения, особенно перевиваемых, и оказывают существенное влияние на результаты экспериментов с использованием таких культур, что особенно важно для вирусологических исследований.

Материал и методы

В работе использовали культуральную жидкость штамма *Trichoderma harzianum* Rifai, продуцента противопохлевого и антивирусного фермента L-лизин- α -оксидазы, депонированного в Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером F-180.

Штамм триходермы, культивировался на среде по ранее разработанной методике. Культуру выращивали в течении 14 суток на твёрдой питательной среде с пшеничными отрубями поверхностным способом в колбах вместимостью 250 мл. Выросшую культуру гриба вносили в колбы с жидкой питательной средой аналогичного состава. Полученный инокулят использовали в ферментации на оборудовании Опытной технологической установки ИБФМ РАН им. Г.К.Скрябина (г. Пушкино). Использовали ферментёр типа БИОР-01 производства ОКБ ТБМ (г. Кириши), объёмом 100 л с коэффициентом заполнения 0,6. Ферментёр оснащён магнитной мешалкой, фильтрами тонкой очистки воздуха, датчиками температуры и pH. Питательную среду готовили непосредственно в аппарате. Для этого в аппарат заливали 60 л водопроводной воды, вносили 1% пшеничных отрубей, стимулятор — 0,1%, 1,3% сульфата аммония, значение pH 5,8—6,0 устанавливали 10% раствором HCl. Пшеничные отруби и стимулятор предварительно замачивали в 10 литрах воды в течение 4 ч, стерилизовали в автоклаве 1 ч при 125°C, затем вносили в ферментёр, где их ещё раз стерилизовали вместе с другими компонентами. Подготовленный ферментёр засеивали посевным материалом из колб, вышеописанным способом. Посевная доза не менее 5%. Культивирование проводили при температуре 26°C, расход воздуха на протяжении всей ферментации 30

л в минуту, скорость вращения мешалки 200 оборотов в минуту. Величину pH в процессе роста корректировали до 6,5, продолжительность выращивания 94—98 часов. По окончании ферментации культуральную жидкость направляли на участок предварительной очистки, где мицелий гриба отделяли фильтрованием под вакуумом на нутч-фильтре. Вес полученной биомассы составил 3,5 кг. Полученный нативный раствор подвергали дополнительному сепарированию на сепараторе типа ОСБ при 9000 об/мин. в течение часа при температуре 2—4°C. Затем нативный раствор в объёме 55 л. после отделения биомассы, концентрировали до 1,5 л. Полученный концентрат культуральной жидкости с активностью в культуральной жидкости 0,54—0,56 Ед/мл. использовали для изучения антимикоплазменной активности.

Активность L-лизин- α -оксидазы в концентрате культуральной жидкости *Trichoderma* рассчитывали по приросту H₂O₂, количество которой определяли спектрофотометрическим ортодиазидиновым микрометодом [4].

В работе использовали три вида микроорганизмов класса Mollicutes: 2 вида представители семейства Mycoplasmataceae: *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma fermentans* и один вид представитель семейства Aholoplasmataceae: *Aholeplasma laidlawii*. Штамм *M. hominis* H-34 был получен в 1967г. из коллекции доктора Lemke R.M. (Lister Inst. Preventive medicine, London S.W.1.). Штамм *M. fermentans* Pg 18 получен от доктора Freundt (Inst. of Medical Microbiol. Univer. of Aarhus, Дания). Штамм *A. laidlawii* был получен в 1963 г. от доктора Koller (Йена, ГДР). Все штаммы хранились и поддерживались в лаборатории микоплазм и L-форм бактерий (ФГБУ НИИЭМ им. поч. ак. Н. Ф. Гамалеи).

Для выращивания микоплазм использовали бульон (Difco PPLO Broth, Becton, Dickinson, USA) с 20% сыворотки крови лошади, 2% свежего дрожжевого экстракта, 1% аргинина или 1% глюкозы (в зависимости от пищевых потребностей вида микоплазм) и 0,005% индикатора фенолово-красного. Для титрования культур делали серийные десятикратные разведения пробы в физиологическом растворе с высевом материала из всех разведений на 0,3 % агар (BBL Mycoplasma Agar Base, Becton, Dickinson, США) с такими же добавками, как в бульоне. Спустя 3 суток подсчитывали число колоний в двух последних пробирках из ряда разведений и высчитывали средний показатель числа колоний. Титр культур выражали средним числом выросших колоний, помноженным на разведение культуры. В опыт брали культуры с установленным ранее титром.

Опыты по определению чувствительности микоплазм к ферменту проводили в двух вариантах. В табл. 1, 2 представлены средние результаты из двух опытов.

Вариант 1. В пробирки со средой культивирования (9,8 мл) вносили по 0,1 мл культуральной жидкости триходермы неразведенной и в разведениях 1:10 и 1:100 и 0,1мл культуры микоплазмы с известным титром. Таким образом, в опытных пробирках в 10 мл среды содержалась культуральная жидкость с активностью L-лизин- α -оксидазы 0,54—0,56 Ед/мл в количестве 0,1 мл, 0,01 мл, 0,001мл.

Пробирки культивировали 3 суток. Контролем служили посеы микоплазм в такую же среду, но не содержащую культуральную жидкость продуцента L-лизин- α -оксидазы. Об интенсивности роста судили по скорости изменения цвета индикатора. *M. hominis* разлагает аргинин среды с выделением аммиака и цвет среды изменяется из красного в малиновый за счёт её защелачивания. *M. fermentans* и *A. laidlawii* разлагает глюкозу, что сопровождается изменением pH среды в кислую сторону и изменением её цвета из красного в жёлтый. Изменение цвета среды регистрировали ежедневно. Титрование выросших культур микоплазм проводили через 72 ч культивирования.

Вариант 2. В пробирки вносили 1 мл бульонной культуры микоплазм с известным титром, затем соединяли с 1 мл культуральной жидкости с активностью L-лизин- α -оксидазы

Таблица 1. Результаты испытания антимикоплазменной активности культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 при различных концентрациях в среде культивирования (1 мл в 10 мл среды) (вариант 1)

Вид	Культура исходный титр, КОЕ/мл	Контроль оценка роста		Оценка активности фермента			
		по изменению рН среды	по титру, КОЕ/мл	по изменению рН среды			по титру, КОЕ/мл 0,1 мл
				0,1 мл	0,01 мл	0,001 мл	
<i>M.hominis</i> Н-34	10 ⁷	+	10 ⁷	+	+	+	0,7 • 10 ⁶
—//—	10 ⁵	+	10 ⁷	—	+	+	2 • 10 ⁴
<i>M.fermentans</i>	10 ⁷	+	10 ⁷	+	+	+	3 • 10 ⁷
—//—	10 ⁵	+	6 • 10 ³	—	+	+	2 • 10 ³
<i>A.laidlawii</i>	10 ⁷	+	10 ⁸	+	+	+	1 • 10 ⁸
—//—	10 ³	+	10 ⁸	+	+	+	1 • 10 ⁸

Примечание. Здесь и табл. 2: 1) «+» — рН среды изменился; «—» — рН среды без изменения; «±» — рН среды изменился незначительно. Указаны средние значения титров из двух опытов.

Таблица 2. Антимикоплазменная активность культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 — продуцента фермента L-лизин- α -оксидазы в различных концентрациях при её контакте с клетками микоплазм (вариант 2)

Вид	Культура Исходный титр, КОЕ/мл	Контроль оценка роста		Оценка активности фермента					
		по изменению рН среды	по титру, КОЕ/мл	по изменению рН среды			по титру, КОЕ/мл		
				неразве- дённый	0,1 мл	0,01 мл	0,001 мл	неразве- дённый	0,1 мл
<i>M.hominis</i> Н-34	10 ⁷	+	10 ⁷	—	±	+	+	нет роста	6 • 10 ⁴
—//—	10 ³	+	10 ⁷	—	—	±	±	—//—	единич.<10 ¹
<i>M.fermentans</i>	10 ⁷	+	10 ⁷	±	±	+	+	2 • 10 ⁴	2 • 10 ⁶
—//—	10 ³	+	10 ⁴	—	±	±	+	1 • 10 ¹	2,5 • 10 ²
<i>A.laidlawii</i>	10 ⁷	+	10 ⁸	+	+	+	+	1 • 10 ⁶	
—//—	10 ³	+	10 ⁸	—	+	+	+	1,8 • 10 ⁶	

0,54—0,56 Ед/мл в тех же разведениях, которые мы использовали в первом варианте. Смеси выдерживали в течении 45 мин при комнатной температуре, затем заливали жидкой питательной средой и культивировали в течении 3 суток, наблюдая за скоростью и интенсивностью роста по изменению цвета культуральной среды. Титр клеток микоплазм в опытной и контрольной пробирке определяли описанным выше способом.

Результаты и обсуждение

Результаты определения антимикоплазменной активности первым вариантом представлены в табл. 1. Из данных таблицы следует, что интенсивность роста *M.hominis*, *M.fermentans*, регистрируемая по изменению рН среды на вторые сутки культивирования, зависела от титра взятой в опыт культуры. На этом сроке отмечали небольшую задержку в интенсивности роста в пробирках с меньшей посевной дозой микоплазм и максимальной дозой активности L-лизин- α -оксидазы культуральной жидкости триходермы. На третьи сутки культивирования рН среды при всех посевных дозах культуры и дозах исследуемой культуральной жидкости продуцента фермента L-лизин- α -оксидазы становилась одинаковой.

Результаты определения антимикоплазменной активности более точным методом — путём титрования выросших культур через 72 ч культивирования показали, что фермент обладает некоторой активностью в отношении *M.hominis*. При высокой посевной дозе микоплазм и увеличения количества культуральной жидкости исследуемого штамма триходермы титр выросшей культуры был на 1lg ниже, чем в контроле. При более низ-

кой посевной дозе титр отличается на 3 Lg (определение проводили только с наивысшим количеством культуральной жидкости триходермы, поскольку только при ней отмечали замедление скорости роста по изменению цвета среды).

Разницы в титре КОЕ/мл культур *M.hominis* и *A.laidlawii* в опыте и контроле не были нами обнаружены.

Результаты определения антимикоплазменной активности вторым вариантом оказались более интересными. Из данных таблицы 2 видно, что в присутствии культуральной жидкости продуцента L-лизин- α -оксидазы скорость роста *M.hominis*, регистрируемая по изменению цвета среды, была снижена, особенно при низкой посевной дозе. Рост других штаммов микоплазм также отставал от роста в контроле, но только при низких посевных дозах.

При определении титра КОЕ/мл наблюдали полное подавление роста при контакте клеток микоплазм при использовании неразведённой культуральной жидкости триходермы с активностью L-лизин- α -оксидазы 0,54—0,56 Ед/мл, даже при высокой посевной дозе. При десятикратном разведении исходной культуральной жидкости триходермы она также подавляла рост микоплазм, но в меньшей степени — на 3 lg. При использовании меньшей посевной дозы микоплазм рост также был подавлен полностью при контакте с культуральной жидкостью продуцента фермента. Использование десятикратного разведения культуральной жидкости в опытных

пробирках приводило к росту лишь единичных колоний.

Титр КОЕ/мл культур *M.hominis* был ниже в сравнении с контролем на 3 Lg и 1 Lg (соответственно) при высокой посевной дозе культуры и разных концентрациях культуральной жидкости продуцента L-лизин- α -оксидазы.

При более низкой посевной дозе и разных концентрациях культуральной жидкости исследуемого штамма -продуцента фермента титр КОЕ выросшей культуры различался на 3 и 2 lg соответственно.

Способность ингибировать рост обнаружена также в отношении *A.laidlawii*. Рост исследуемой культуры отставал на 2 lg на третьи сутки культивирования при разных посевных дозах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Раковская И.В. Микоплазмы-возбудители микоплазменных инфекций человека. В кн. Руководство по медицинской микробиологии / Под ред. А.С. Лабинской и др. М.: БИНОМ, 2010; 964—993.
2. Baseman J.B., Tully J.G. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. Emer Infect Dis 1997; 3: 1: 21—32.
3. Пакина Е.В., Шнейдер Ю.А., Смирнова И.П. Биологическая и биохимическая стабильность метаболитов сапрофитного гриба *Trichoderma harzianum* Rifai. Вестник РУДН, серия «Агрономия и животноводство», 2009; 4: 28—32.
4. Смирнова И.П., Сяткин С.П., Берёзов Т.Т. Спектрофотометрический метод определения L-лизин- α -оксидазы. Вопр мед хим 1984; 1: 133—136.
5. Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Биотехнология фермента L-лизин- α -оксидазы из триходермы. М.: Копиризо, 2014; 189.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что культуральная жидкость *Trichoderma harzianum* Rifai F-180-продуцента противоопухолевого и антивирусного фермента L-лизин- α -оксидазы способна ингибировать рост *Mycoplasma hominis*, которая наглядно проявляется после предварительного контакта микоплазм и культуральной жидкости триходермы. Степень подавления роста зависит от посевной дозы микоплазм и используемой концентрации культуральной жидкости триходермы.