

УДК 632.937.14:612.064

## ОЦІНКА ПАТОГЕННОСТІ ГРУНТОВИХ ГРИБІВ РОДУ *CLADOSPORIUM*

**Н. О. Кравченко, О. Б. Копилова, О. В. Головач, О. М. Дмитрук**

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН  
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: nat.probiotik@gmail.com

*Проведено перевірку патогенних властивостей ґрунтових грибів роду *Cladosporium* Link у гострих дослідках на моделі білих мишей. Визначено LD<sub>50</sub> штамів, проведено патологоанатомічні та бактеріологічні дослідження внутрішніх органів лабораторних тварин. Досліджені штами належать до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджуваних теплокровних тварин і можуть вважатися непатогенними.*

**Ключові слова:** *Cladosporium cladosporioides*, вірулентність, фізіологічний стан мишей, патогенність, інфективність (інвазивність).

Ґрунтові гриби відіграють у природі важливу роль. За сучасними уявленнями царство грибів є одним із найважливіших компонентів екосистем і включає близько 1,5 млн. видів [1]. Як правило, біомаса грибів в орних або лучних ґрунтах не поступається біомасі бактерій [2].

Гриби беруть участь у деструкції органічних речовин при ґрунтоутворенні, а також у процесах біогеохімічної трансформації елементів (N, P, K, S) та ін. Крім того, гриби тісно взаємодіють з рослинами, утворюючи мікоризу та синтезують біологічно активні речовини.

Одними з відомих продуцентів біологічно активних речовин вважаються представники роду *Cladosporium* Link, вперше описаного у 1816 р., що налічує 169 видів і є найпоширенішим серед недосконалих грибів [3].

Слід відмітити, що вказаний рід характеризується високою строкатістю і включає ендofітні, сапротрофні та фітопатогенні гриби. Крім того, представники роду *Cladosporium* можуть бути збудниками хвороб тварин [4; 5].

Представники роду *Cladosporium* виділяються практично з усіх відомих субстратів — ґрунту, опалого листя, стебел трав'янистих і деревних рослин, а також можуть бути супутніми при опортуністичних інфекціях, викликаних іншими збудниками [6–8]. Крім того, *Cladosporium herbarum* відомий

як гіпералергенний агент [9].

Пошук нових штамів грибів роду *Cladosporium*, здатних продукувати біологічно активні речовини та позитивно впливати на ріст і розвиток рослин, а також їх використання як потенційних агентів біопрепаратів є перспективним напрямом сільськогосподарської мікробіології. З огляду на те, що серед представників роду *Cladosporium* трапляються не тільки збудники хвороб рослин, але й тварин, перспективні штами повинні бути безпечними для людини і теплокровних тварин.

Метою нашої роботи було дослідження патогенних властивостей ґрунтових грибів роду *Cladosporium*, що характеризуються здатністю продукувати фітогормональні речовини і можуть бути використані як основа біопрепаратів з рістстимулювальною активністю.

**Матеріали й методи.** У роботі використовували штами грибів роду *Cladosporium* виду *C. cladosporioides* (Fresen.) G. A. de Vries. Штам *C. cladosporioides* 525 виділено з ризосферного ґрунту пшениці ярої, *C. cladosporioides* 495 — з коренів люпину білого сорту Либідь. Штами вирощували на суслотагарі 3–4 ° за Балінгом, рН 6,4–7,0 за температури 25–27 °С.

Суспензії споро-міцеліальних сумішей грибів готували на стерильному ізотонічному розчині натрій хлориду з попереднім дво-

разовим відмиванням від метаболітів та осадженням клітин шляхом центрифугування впродовж 20 хв. за 2000 об./хв. Робочі концентрації клітин грибів у суспензіях встановлювали, користуючись камерою Горяєва.

Патогенні властивості штамів визначали у гострих дослідах на моделі білих безпородних мишей. Статевозрілим білим мишам масою 18–20 г вводили споро-міцеліальні суміші грибів перорально через зонд та внутрішньочеревно шляхом ін'єкцій. Дози для перорального введення містили  $1,0 \cdot 10^6$ ;  $1,0 \cdot 10^7$ ;  $1,0 \cdot 10^8$  клітин ґрунтових грибів, для внутрішньочеревних ін'єкцій —  $1,0 \cdot 10^7$  та  $1,0 \cdot 10^8$  клітин на одну тварину [10]. Лабораторних тварин попередньо упродовж 14 діб адаптували до умов утримання. Догляд та спостереження проводили щоденно впродовж 20 діб поспіль після введення досліджуваного матеріалу [10; 11].

По закінченню терміну спостереження за поведінковими реакціями та фізіологічним станом лабораторних тварин проводили їх вимушений забій, патологоанатомічний розтин, мікроскопічні дослідження мазків-відбитків внутрішніх органів та висіви зразків тканин (печінки, нирок, селезінки) на елективне живильне середовище.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з лабораторними тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та науковою метою» (Страсбург, 1986 р.) [12] і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) [13]. Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [14].

Вірулентність штамів ґрунтових грибів встановлювали за рівнем дози життєздатних мікробних клітин, яка викликає загибель 50 % заражених тварин ( $LD_{50}$ ). Критерієм авірулентності мікроорганізмів була відсутність загибелі мишей упродовж 20 діб та характерних для інфекційної патології змін у внутрішніх органах тварин за результатами патологоанатомічного розтину.

Інфективність (інвазивність) штамів грибів визначали шляхом висіву зразків тканин (печінки, нирок, селезінки) вимушено заби-

тих тварин на сусло-агар. Відсутність типового для досліджуваних штамів ґрунтових грибів росту вказувала на їх неінфективність.

**Результати та їх обговорення.** Досліджувані штами на сусло-агарі ростуть повільно, їх колонії сягають на 4–5-у добу 20–26 мм у діаметрі (за температури 25–27 °С). Колонії розпростерті, оливково-зелені, бархатисті, на зворотному боці зеленувато-чорні. Конідієносці добре виражені, довжиною до 350 мкм, товщина — 2–6 мкм, блідо-оливкові, гладенькі та дрібнобородавчасті. Конідії як одноклітинні, так і з однією перетинкою,  $30 \times 2$ –5 мкм, гладенькі та дрібнобородавчасті. Конідії в довгих ланцюжках, частіше одноклітинні, еліптичні,  $3$ – $11 \times 2$ –5 мкм, у більшості  $3$ – $7 \times 2$ –4 мкм. Штами резистентні до антибіотиків (пеніциліну, стрептоміцину). Досліджуваний вид мікроорганізмів не включено до переліку небезпечних біологічних об'єктів, які можуть інфікувати людей і тварин або бути для них токсичними чи алергічними чинниками [15–17]. Проте серед широко поширених у найрізноманітніших субстратах рослинного та тваринного походження представників роду *Cladosporium* трапляються види, що викликають захворювання органів дихання, шкіри та шлунково-кишкового тракту, особливо у дітей. Тому, щоб підтвердити безпечність для теплокровних лабораторних тварин перспективних для створення біопрепаратів рідстимулюючої дії грибів *C. cladosporioides* 495 та *C. cladosporioides* 525, досліджували один із показників патогенності мікроорганізмів — вірулентність [17–21].

За час спостереження після як перорального, так і внутрішньочеревного введення *C. cladosporioides* 495 загибелі лабораторних тварин не відмічали (табл. 1).

Тварини добре поїдали корм, мали жвавий вигляд та блискучий хутряний покрив. Вірогідної різниці у масі та температурі тіла дослідних і контрольних тварин, а також в загальному стані організму та поведінці не відмічено. Тварини були активними, фізіологічні функції організму в нормі, клінічних ознак токсикозу не спостерігали. Разом із тим, у VII та VIII дослідних групах тварин, яким було введено споро-міцеліальну суспензію *C. cladosporioides* 525 у дозі  $1 \cdot 10^8$  клітин на мишу, відмічено загибель по одній

Таблиця 1. Результати дослідження вірулентності ґрунтових грибів роду *Cladosporium*, n = 5

Матеріал для введення	Група тварин	Спосіб введення	Курс введення, діб	Доза		Кількість мишей, гол.	
				см <sup>3</sup>	млн. клітин	загинуло	вижило
Споро-міцеліальна суспензія <i>C. cladosporioides</i> 495	I	в/ч <sup>1</sup>	1	1,0	10,0	0	5
	II	в/ч	1	1,0	100,0	0	5
	III	per os <sup>1</sup>	1	1,0	100,0	0	5
	IV	per os	1	1,0	10,0	0	5
	V	per os	1	1,0	1,0	0	5
Споро-міцеліальна суспензія <i>C. cladosporioides</i> 525	VI	в/ч	1	1,0	10,0	0	5
	VII	в/ч	1	1,0	100,0	1 <sup>2</sup>	4
	VIII	per os	1	1,0	100,0	1 <sup>3</sup>	4
	XI	per os	1	1,0	10,0	0	5
	X	per os	1	1,0	1,0	0	5
Контроль — ізотонічний розчин	I	в/ч	1	1,0	0	0	5
	II	per os	1	1,0	0	0	5

Примітки: 1) в/ч — внутрішньочеревне введення, per os — введення через рот; 2) загинула на 11-у добу; 3) загинула на 17-у добу.

тварині на 11-у добу за внутрішньочеревного введення та на 17-у добу — за перорального. За результатами патологоанатомічного розтину загинлої тварини з дослідної групи VII встановлено збільшення у розмірі печінки та селезінки. Поверхня органів була нерівномірно блискучою, на печінці відмічали ділянки блідого кольору та смугасті крововиливи. На розтині загинлої лабораторної миші з дослідної групи VIII відмічено здуття петель кишкового уздовж всього шлунково-кишкового тракту. Решта тварин упродовж періоду спостереження залишалися живими, вірогідної різниці в масі, температурі тіла та поведінці між контрольними та дослідними тваринами не відмічали. Отже, одержані результати свідчать про авірулентність ґрунтових грибів *C. cladosporioides* 495 та *C. cladosporioides* 525, оскільки середня летальна доза за перорального та внутрішньочеревного введення їх суспензій становить  $LD_{50 \text{ per os}} > 1,0 \cdot 10^8$  клітин/тварину,  $LD_{50 \text{ в/ч}} > 1,0 \cdot 10^8$  клітин/тварину. Розтин вимушено забитих білих мишей усіх дослідних та контрольних груп продемонстрував відсутність видимих ознак патологоанатомічних змін у внутрішніх органах тварин після введення ґрунтових грибів *C. cladosporioides* 495 та *C. cladosporioides* 525 (табл. 2).

За результатами мікробіологічних досліджень проб внутрішніх органів тварин як до-

слідних, так і контрольних груп не встановлено росту ретрокультур досліджуваних грибів. Отже, можна зробити висновок, що ґрунтові гриби *C. cladosporioides* 495 та *C. cladosporioides* 525 у застосованих концентраціях не проникають у внутрішні органи тварин, не розмножуються в них та не викликають типових для інфекційного процесу змін. Авірулентність вищезазначених штамів грибів роду *Cladosporium* для теплокровних тварин підтверджується даними середніх летальних доз як за перорального, так і за внутрішньочеревного введення.

Таким чином, згідно отриманих результатів, ґрунтові гриби *C. cladosporioides* 495 та *C. cladosporioides* 525 належать до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи досліджених теплокровних тварин і можуть бути використані як основа біопрепаратів рістстимулювальної дії.

1. Введение в генетику грибов / [Ю. Т. Дьяков, А. В. Шнырева, А. Ю. Сергеев]. — М. : Академия, 2005. — 304 с.

2. Bailey V. L. Fungal-to-bacterial biomass ratios in soils investigated for enhanced carbon sequestration / V. L. Bailey, J. L. Smith, H. Jr. Bolton // Soil BiolBiochem. — 2002. — Vol. 34. — P. 997–1007.

3. Рьжкин Д. В. Мониторинг концентрации спор грибов *Cladosporium* и *Alternaria* в атмос-

Таблиця 2. Результати патологоанатомічного дослідження внутрішніх органів вимушено забитих лабораторних тварин

Назва досліджуваного органу	Результати патологоанатомічного дослідження	
	Споро-міцеліальна суспензія <i>C. cladosporioides</i> 495	Споро-міцеліальна суспензія <i>C. cladosporioides</i> 525
Місце введення	без видимих ознак запального процесу	без видимих ознак запального процесу
Серце	в межах анатомічної норми	в межах анатомічної норми
Легені	в об'ємі не збільшені, поверхні гладенькі, спайок не відмічено, долі легко відокремлюються одна від одної	в об'ємі не збільшені, поверхні гладенькі, спайок не відмічено, долі легко відокремлюються одна від одної
Шлунок, петлі тонкого і товстого кишковика	зовні без змін та ознак здуття, на розрізі малюнок слизової незмінний	зовні без змін та ознак здуття, на розрізі малюнок слизової незмінний
Печінка	темно-червоного кольору, в об'ємі не збільшена, пружної консистенції, середнього кровонаповнення, поверхня гладенька	темно-червоного кольору, в об'ємі не збільшена, пружної консистенції, середнього кровонаповнення, поверхня гладенька
Нирки	бобоподібної форми, не збільшені, поверхні гладенькі, на розрізі чітко видно малюнок кіркової і мозкової зон, межа між зонами не згладжена	бобоподібної форми, не збільшені, поверхні гладенькі, на розрізі чітко видно малюнок кіркової і мозкової зон, межа між зонами не згладжена
Селезінка	пружної консистенції, в об'ємі не збільшена, на розрізі пульпа помірно повнокровна, темного кольору.	пружної консистенції, в об'ємі не збільшена, на розрізі пульпа помірно повнокровна, темного кольору.

ферном воздухе г. Москвы / Д. В. Рыжкин, С. Н. Еланский, Т. М. Жёлтикова // Пульмонология и аллергология. — 2002. — № 2. — С. 30–31.

4. Check-list of *Cladosporium* names / [F. M. Dugan, K. Schubert, U. Braun et al.]. — Schlechtendalia, 2004. — Vol. 11. — P. 1–103.

5. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera / P. W. Crous, U. Braun, K. Schubert, J. Z. Groenewald // Stud Mycol. — 2007. — Vol. 58. — P. 33–56.

6. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast.&Germ. / T. Sieber, T. K. Riesen, E. Müller, P. M. Fried // Journal of Phytopathology. — 1988. — Vol. 122, № 4. — P. 289–306.

7. Brown K. B. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia / K. B. Brown, K. D. Hyde, D. I. Guest // Fungal Diversity. — 1998. — Vol. 1. — P. 27–51.

8. El-Morsy E. M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt / E. M. El-Morsy // Fungal Diversity. — 2000. — Vol. 5. — P. 43–54

9. Atlas of clinical fungi / [G. S. de Hoog, J. Guarro, J. Gene, M. J. Figueras]. — 2<sup>nd</sup> ed. — Reus : Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht/Universitat Rovira i Virgili, 2000. — 1126 p.

10. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожемякін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А. — К. : МОЗУ, Фармкомітет, 2002. — 156 с.

11. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды. — М., 1991.

12. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [електронний ресурс] // European treaty series. — Strasbourg, 1986. — № 123. — 50 p. — Режим доступу : <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Word/123.doc>.

13. Резников О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О. Г. Резников // Ендокринологія. — 2003. — Т. 8, № 1. — С. 142–145.

14. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. — 86/609/EC. — 20.10.2010 // Official journal of the European Union. — L276/33–79.

15. Безпека роботи з мікроорганізмами I–II групи патогенності. Державні санітарні правила МОЗ України, ДСП 9.9.5.035.99.

16. Директива 90/679 Ради Європейської економічної співдружності.

17. Категорії біологічних агентів у відповідності до небезпеки та категорії контамінації. — видання 4-ге. — ВООЗ, Консультативний комітет небезпеки патогенів, 1995.

18. Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших,

микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения. — МЗ СССР, 1980.

19. Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсико-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів : методичні вказівки. — К. : МОЗ України, 2004.

20. Обоснование критериев оценки патогенности мицелиальных грибов-продуцентов и допустимости их применения в промышленности : методические рекомендации. — Ангарск, 1986.

21. Постановка исследований для обоснования предельно-допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны : методические указания. — М., 1983.

## ОЦЕНКА ПАТОГЕННОСТИ ПОЧВЕННЫХ ГРИБОВ РОДА *CLADOSPORIUM*

Н. А. Кравченко, О. Б. Копылова,  
А. В. Головач, Е. Н. Дмитрук

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

*Проверка патогенных свойств почвенных грибов рода *Cladosporium* Link выполнена в острых опытах на модели белых мышей. Определена LD<sub>50</sub> штаммов, проведены патологоанатомические и бактериологические исследования внутренних органов лабораторных животных.*

*Согласно полученных результатов исследованные штаммы грибов рода *Cladosporium* принадлежат к группе авирулентных микроорганизмов, не способных к инвазии во внутренние органы исследованных теплокровных животных и могут считаться непатогенными.*

Ключевые слова: *Cladosporium cladosporioides*, вирулентность, физиологическое состояние мышей, патогенность, инфективность (инвазивность).

## EVALUATION OF *CLADOSPORIUM* SOIL MOLDS PATHOGENICITY

N. O. Kravchenko, O. B. Kopylova,  
O. V. Golovach, O. M. Dmytruk

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*Verification of soil molds from *Cladosporium* genus was performed in acute experiments with white mice. LD<sub>50</sub> of the studied strains was determined followed by the pathological and bacteriological examinations of the inner organs of laboratory animals. It was revealed that studied *Cladosporium* strains belong to the group of avirulent microorganisms not capable of invasion of the inner organs of the studied warm-blooded animals and thus can be considered as non-pathogenic.*

Key words: *Cladosporium cladosporioides*, virulence, physiological condition of mice, pathogenicity, infectivity (invasiveness).