

А.В. Руденко¹, М.М. Саприкіна²,
В.В. Гончарук²

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДУ ВІЯВЛЕННЯ МІКРОМІЦЕТІВ З РІЗНОГО БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ТА ВОДИ

¹ Інститут урології АМН України, м. Київ

² Інститут колоїдної хімії та хімії води
НАН України м. Київ

Мікроміцети становлять серйозний ризик для здоров'я людей з пониженою імунореактивністю, особливо для осіб з новоутвореннями і аутоімунними захворюваннями, хворими на СНІД, осіб після трансплантації органів [2, 4, 5]. За останні роки кількість публікацій щодо негативного впливу мікроміцетів на здоров'я людей значно зросла [1]. Попередніми дослідженнями встановлено широке розповсюдження мікроміцетів, що належать до родів: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, які за класифікацією ВООЗ та РФ мають відповідний ступінь ризику (BSL) для здоров'я людини [3, 6].

Виявлення цих мікроорганізмів здійснюють з використанням різноманітних живильних середовищ [7–9]. Загальним недоліком існуючих методів є складність видової ідентифікації грибів, особливо при виділенні одночасно декількох видів. Проблема виникає перш за все тому, що зазвичай в аналізованому зразку присутні швидко й повільноростучі гриби. Тому виділення чистої культури для подальшої ідентифікації є вкрай складною задачею в лабораторній діагностиці. Метою даної роботи було розробити поживне середовище, що гальмує швидкість росту грибів, але спектр виділених ізолятів зберігається сталим.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліди проводили з використанням мікроскопічних грибів *Aspergillus niger* v. *Tiegh* (швидко утворюють колонії), та *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries, *Penicillium multicolor* Grigorieva-Manoilova et Paradielova (повільно утворюють колонії).

Як поживне середовище використано агар Сабуро, а як інгібітор грибів — розчин дихлорану — ДХ (2,6-дихлор-4-нітроанілін, $C_6H_4Cl_2N_2O_2$), який готували таким чином: наважку дихлорану 100 мг розчиняли в 50 см³ етанолу. Концентрація

робочого розчину складала 2 г/дм³, необхідний об'єм якого вносили на 1 дм³ розплавленого живильного середовища Сабуро перед стерилізацією. Досліджували вплив 0,5; 1,0; 2,0 та 4,0 мг/дм³ ДХ на ріст мікроміцетів.

З попередньо вирощених чистих культур мікроскопічних грибів готували водні суспензії, які отримували при фільтруванні крізь стерильне скловолочно змивів культури з поверхні середовища стерильною водою з використанням стерильного шпателя. Концентрація культур в суспензіях становила — $5 \cdot 10^5$ КУО/см³ *C. cladosporioides*, $1 \cdot 10^7$ КУО/см³ — *P. multicolor*, *A. niger*. Один кубічний сантиметр відповідного розведення суспензії грибів вносили в чашки Петрі, з розрахунку, що на чашці повинно вирости не більше 20–300 окремих колоній, та заливали 20 см³ теплого середовища Сабуро без та з ДХ. Засіяні чашки культивували при 28°C у термостаті протягом 7 діб з щоденним спостереженням за кількістю та розміром колоній.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведено ряд експериментів з метою встановлення оптимальної концентрації ДХ, яка б уповільнювала ріст швидкоростучих видів і при цьому не впливала на якісний та кількісний склад повільноростучих видів грибів.

Встановлено, що кількість колоній *C. cladosporioides* на середовищі Сабуро, з концентрацією ДХ 0,5; 1,0 та 2,0 мг/дм³ та на середовищі без ДХ зрівнялася лише на 7 добу спостереження, а розмір колоній на цей час був менший на 33,3 та 63,3% для концентрацій ДХ відповідно 1,0 та 2,0 мг/дм³. У випадку внесення 0,5 мг/дм³ ДХ до середовища Сабуро розмір колоній *C. cladosporioides* не відрізнявся від їх розміру на середовищі, яке не містило інгібітору. На живильному середовищі Сабуро з 4 мг/дм³ ДХ, кількість мікроскопічних грибів не зрівнялася з їх кількістю на середовищі Сабуро без ДХ протягом всієї тривалості досліджень, а розмір колоній у цьому випадку був менший на 71,7% навіть на 7 добу спостереження (табл. 1).

У табл. 2 наведено результати дослідження впливу ДХ на ріст *P. multicolor*. У цьому випадку концентрація ДХ в середовищі Сабуро на рівні 0,5 мг/дм³ призводила до зменшення розміру колоній мікроскопічного гриба на 9%, по відношенню до їх розміру на середовищі без ДХ, а концентрації 1,0, 2,0 та 4,0 мг/дм³ зменшували розмір колоній на 28,6%, 29,9 та 44,2% відпо-

Вплив різної концентрації дихлорану та тривалості інкубації на ріст *C. cladosporioides*

Тривалість інкубації, доба	КУО/см ³					Середній діаметр колоній, мм				
	Концентрація дихлорану, мг/дм ³									
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	0	0,5	1,0	2,0	4,0
3	100	82	44	1	0	1,5	0,8	0,8	0,8	—
4	124	148	95	9	2	2,0	1,6	1,3	1,2	1,0
5	170	158	177	26	36	4,0	3,4	2,1	1,8	1,1
6	224	180	214	135	107	5,0	4,1	2,7	1,6	1,6
7	224	224	224	224	153	6,0	6,0	4,0	2,2	1,7

Таблиця 2

Вплив різної концентрації дихлорану в поживному середовищі та тривалості інкубації на ріст *P. multicolor*

Тривалість інкубації, доба	КУО/см ³					Середній діаметр колоній, мм				
	Концентрація дихлорану, мг/дм ³									
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	0	0,5	1,0	2,0	4,0
3	116	100	132	104	102	3,5	3,5	1,8	1,5	1,0
4	165	161	144	169	126	4,0	4,1	2,1	1,8	1,5
5	182	163	163	178	145	7,0	6,2	4,3	2,9	2,9
6	186	177	172	184	157	7,1	6,5	5,4	4,3	3,7
7	186	186	187	186	167	7,7	7,0	5,5	5,4	4,3

відно. Слід зауважити, що і у цьому випадку концентрація ДХ в середовищі Сабуро на рівні 4 мг/дм³ знижує кількісні показники виявлення мікроміцетів. Так, на 7 добу спостереження виросло 89,9% від кількості колоній, отриманих на Сабуро без ДХ. Вміст реагенту в поживному середовищі в інтервалі 0,5–2 мг/дм³ не мав такої дії на кількість колоній *P. multicolor* (табл. 2).

Особливе значення для обліку мікроміцетів і дріжджеподібних грибів мають дослідження щодо затримки повзучого росту і спороношення *A. niger*, оскільки за наявності *A. niger*, що є

представником швидкоростучих видів, вся чашка швидко покривається повітряним міцелієм.

Як видно з табл. 3, при концентрації ДХ 0,5 та 1,0 мг/дм³ вже на 3 добу інкубації подекуди спостерігається злиття декількох колоній *A. niger* за рахунок досить великого їх діаметру, а на 5 добу взагалі неможливо продовжувати кількісні підрахунки, так як колонії вистеляють чашку суцільним густим міцелієм. Підвищення концентрації ДХ до 2,0 та 4,0 мг/дм³ стримує ріст колоній *A. niger*, що дозволяє продовжувати підрахунки.

Таблиця 3

Вплив різної концентрації дихлорану та тривалості інкубації на ріст *A. niger*

Тривалість інкубації, доба	КУО/см ³					Середній діаметр колоній, мм				
	Концентрація дихлорану, мг/дм ³									
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	0	0,5	1,0	2,0	4,0
2	83	82	78	70	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3	67	75	62	84	110	8,0	6,6	6,0	4,4	1,8
4	*	80	78'	90	112	—	13,2	11,2	7,8	2,3
5	*	*	*	95	110	—	—	—	8,0	3,8
7	*	*	*	109	109	—	—	—	8,5	5,0

Примітка. * — чашка встелена міцелієм мікроскопічного гриба.

Вплив різної концентрації дихлорану та тривалості інкубації на ріст *A. niger*, *P. multicolor*, *C. cladosporioides*

Тривалість інкубації, доба	Окремі види грибів						Суміш грибів					
	<i>A. niger</i>		<i>C. cladosporioides</i>		<i>P. multicolor</i>		<i>A. niger</i>		<i>C. cladosporioides</i>		<i>P. multicolor</i>	
	КУО/см ³	Ø, мм	КУО/см ³	Ø, мм	КУО/см ³	Ø, мм	КУО/см ³	Ø, мм	КУО/см ³	Ø, мм	КУО/см ³	Ø, мм
Сабуро без дихлорану												
3	40	6	90	3	87	4	15	5	8	2	6	2
5	*	—	83	4	70	7	*	—	*	—	*	—
7	*	—	75	6	64	8	*	—	*	—	*	—
Сабуро з дихлораном												
3	80	2,5	18	1,8	54	2	18	1	1	1	22	1
5	74	5,8	46	2	110	3	24	1,8	38	1,5	34	2
7	60	6,5	125	2,5	116	5,5	36	3	56	2	45	3

Примітка. * — чашка встелена міцелієм мікроскопічного гриба.

Отже, отримані результати на зазначених культурах, що є типовими представниками швидко-ростучих та повільноростучих видів грибів, свідчать, що внесення у агаризоване середовище Сабуро 2 мг/дм³ ДХ обмежує діаметр колоній, але не впливає на видовий спектр мікроміцетів.

Встановлено, що у випадку одночасної наявності кількох видів грибів в досліджуваних пробах на кількість та розмір утворених в процесі дослідження колоній окрім ДХ впливає також дія одного виду гриба на інший. Так, при обраній оптимальній концентрації ДХ рівній 2 мг/дм³, присутність мікроскопічних грибів таких як *C. cladosporioides*, *P. multicolor* та *A. niger* за їх однакової початкової концентрації кількість колоній *C. cladosporioides* значно менша очікуваної, як при використанні Сабуро з ДХ, так і без ДХ. Також слід зазначити зменшення діаметру колоній *C. cladosporioides* на середовищі Сабуро, яке не містило ДХ, що вказує на пригнічення даного виду мікроміцетів іншими культурами (табл. 4).

Отримані дані ще раз підтверджують необхідність вибору такої концентрації ДХ, яка б навіть при наявності представників різних видів мікроміцетів не впливала на їх видовий спектр, а була достатньою для пригнічення повзучого росту мікроміцетів та зменшення діаметру колоній.

Отже, встановлено, що вміст ДХ в живильному середовищі, на рівні 1,0 та 2,0 мг/дм³ зменшує діаметр колоній мікроміцетів, що повільно утворюють колонії на живильному середовищі, а саме *C. cladosporioides*, *P. multicolor*, але при цьому

не впливає на кількісні показники цих видів. Концентрація ДХ 0,5 мг/дм³ майже не впливає на розмір колоній, а 4 мг/дм³ призводить до зниження кількісних показників грибів навіть на 7 добу спостереження.

При наявності у біологічному матеріалі або воді грибів, що здатні швидко утворювати колонії, а саме *A. niger* підвищення концентрації ДХ до 2,0 та 4,0 мг/дм³ сприяє зменшенню діаметру колоній та затриманню спороношення, однак не впливає на їх кількісний показник.

Ефективний кількісний та якісний аналіз зразка при сумісній присутності грибів, що є представниками різних видів, здатних як швидко, так і повільно утворювати колонії, можливий лише при концентрації ДХ у живильному середовищі на рівні 2 мг/дм³. Оскільки, як показали наші дослідження, саме ця концентрація інгібітору затримує ріст колоній мікроміцетів, що дозволяє виявляти різні види грибів, і водночас не впливає на їх видовий спектр.

Отже, розроблено метод виділення мікроміцетів з різного біологічного матеріалу та із води, що полягає у використанні живильного середовища Сабуро з додаванням ДХ. Встановлено, що концентрація ДХ 0,5 та 1,0 мг/дм³ є недостатньою для обмеження розміру колоній мікроміцетів та їх міцелію, а концентрація 4 мг/дм³ знижує кількісні показники як повільно — так і швидко-ростучих видів грибів. В зв'язку з цим, обрано оптимальну концентрацію ДХ в живильному середовищі Сабуро, що становить 2 мг/дм³. При

цьому навіть на 7 добу спостереження утворюються окремі, невеликого розміру колонії досліджуваних нами мікроскопічних грибів.

Використання обраної концентрації ДХ дозволяє зменшити розмір колоній, а також затримує повзучий ріст швидкоростучих видів грибів та стримує їх спороношення, що робить підрахунок мікроміцетів при аналізі зразків більш інформативним. Запропонований метод визначення мікроскопічних грибів простий, а компоненти живильного середовища доступні у використанні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А. Микроскопические грибы в связи с проблемами биологической безопасности (обзор) // Проблемы медицинской микологии. — 2011. — Т. 13, № 3. — С. 3–12.
2. Проблема инфицирования воды возбудителями микозов и перспективы ее решения / А.В. Руденко, Э.З. Коваль, О.С. Савлук // Химия и технология воды. — 2004. — Т. 26, № 2. — С. 120–144.
3. Список возбудителей заболеваний (патогенов) человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю. Указ Президента РФ от 8 августа 2001 г. № 1004.
4. Anaissie E.J., Stratton S.L., Dignani M.C., Lee C., Summerbell R.C., Rex J.H., Monson T.P., Spencer T., Kasai M., Francescconi A., Walsh T.J. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study // Clin. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 34. — P. 780–789.
5. Hageskal G., Lima N., Skaar I. Review. The study of fungi in drinking water // Mycological research. — 2009. — Vol. 113. — P. 165–172.

6. Laboratory biosafety manual, 3rd edition. Geneva: World Health Organization, 2004. — 178 p.
7. Labuda R., Tancinova D. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity // Ann. Agric. Environ. Med. — 2006. — Vol. 13. — P. 193–200.
8. Pereira V.J., Fernandes D., Carvalho G., Benoliel M.J., San Roma M.V., Barreto Crespo M.T. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods // Water research. — 2010. — Vol. 44. — P. 4850–4859.
9. Tournas V.H., Kohn J.S., Katsoudas E.J. The identification of antibacterial compounds for the development of enhanced media for the detection of foodborne fungi // International Journal of Food Microbiology. — 2007. — Vol. 118. — P. 83–86.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОМИЦЕТОВ ИЗ РАЗЛИЧНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ВОДЫ

А.В. Руденко, М.Н. Сапрыкина, В.В. Гончарук

Усовершенствован метод выделения микромицетов, который основан на использовании питательной среды Сабуро с дихлораном. Изучено влияние дихлорана на широкий спектр микромицетов, принадлежащих к разным родам. Выбрана оптимальная концентрация дихлорана.

IMPROVING OF THE METHOD OF ALLOCATION MICROMYCETES FROM DIFFERENT BIOLOGICAL MATERIAL AND WATER

A.V. Rudenko, M.N. Saprykina, V.V. Goncharuk

The method of determination of microscopic fungi which is based on the use of nourishing medium of Saburo with a dichloran is improved. Influence of dichloran on the wide spectrum of microscopic fungi, belongs to different species is studied. It optimum concentration is chosen.



JUS ISO 9001

Дочірнє підприємство
**«СПЕКТАР-
Україна»**

З 2010 року ДП «Спектар-Україна» представляє одно- та 8-канальні лабораторні дозатори варіабельного об'єму виробництва ANH Biotechnologie GmbH (Німеччина), які вигідно вирізняються оптимальним поєднанням прийнятної ціни та високої якості.

Вся продукція має сертифікати якості CE, ISO та зареєстрована в МОЗ України.

ДП «СПЕКТАР-Україна»

03680, Київ, вул. Боженко, 31, офіс 352. Тел./факс: 522-95-69, 502-68-10, 529-41-61.

ЗАПРОШУЄМО ДО СПІВРОБІТНИЦТВА ДИЛЕРІВ !!!