

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
*CANDIDA SPP*****И.С. Черней, А.Н. Широкова, В.Т. Чешевик***Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, semitcko.i@yandex.ru*

Введение. Дрожжеподобные грибы рода *Candida* представляют собой аэробные одноклеточные организмы. Являются условно-патогенными [5]. Состоят из клеток овальной формы, псевдогиф и септированных гиф размером до 8 мкм, размножающихся почкованием. Половая стадия отсутствует (дейтеромицеты) [2].

Существует более 150 видов грибов этого рода, которые более правильно классифицировать по их способности вызывать патологический процесс. К наиболее часто встречающимся относят виды: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*. Реже встречаются: *C. rugosa*, *C. inconspicua*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. kefir*, *C. dubliniensis* [3].

Большинство видов *Candida spp.* являются ассоциантами нормальной микрофлоры тела человека и животных [1]. Но данный род грибов при чрезмерном росте может привести к серьезным заболеваниям.

Кандидоз представляет собой хроническую антропонозную оппортунистическую грибковую инфекцию, как правило возникающую у людей со сниженным иммунитетом, отличающуюся полиморфизмом проявлений от бессимптомного кандидоносительства до генерализованных форм [6].

Для выявления заболевания необходима лабораторная диагностика, состоящая из трех этапов:

1. Получение накопительной культуры;
2. Получение чистой культуры;
3. Идентификация выделенной культуры гриба.

Для получения накопительной культуры необходимо создать элективные условия, которые обеспечат развитие преимущественно исследуемой группы микроорганизмов. Методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного микроорганизма за счет создания благоприятных условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его из популяции.

Качество накопительной культуры непосредственно влияет на следующие этапы исследования, поэтому важно с самого начала работы с культурой выбрать правильные условия для работы с ней. У большинства видов дрожжей минимальная температура роста находится в пределах от 0 до 5 °С, а максимальная от 30 до 40 °С. Почти все дрожжи могут расти при комнатной температуре от 20 до 25 °С [4]. Оптимальные значения рН для роста большинства дрожжевых грибов находятся в области средней кислотности (рН 4-6). Однако отдельные виды способны развиваться в более кислой среде. Дрожжи, которые могли бы расти при щелочных значениях рН (8 и более), не известны [4].

Целью исследования явилось определение оптимальных условий культивирования *Candida spp.* для получения накопительной культуры.

Материалы и методы. Для исследования роста клеток дрожжей рода *Candida* использовали следующие питательные среды: среда Чапека, МПА (мясопептонный агар), Сабуро (жидкая и плотная), среда Сабуро с левомицетином, YPD (дрожжевой агар-пептон-декстроза), среда Кристенсена с мочевиной, Гисса (лактоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, маннит), фетальная бычья сыворотка.

Для определения оптимальных условий культивирования был произведен пересев маточной культуры *Candida* на жидкую питательную среду (бульон Сабуро). Термостатировали при температуре 37 ± 1 °С 24 ± 3 ч. Через 24 часа инкубирования методом десятикратных разведений получили разведения от исходного до разведения 10^{-5} и пересели на пять твердых питательных сред описанных выше. Культивирование проводилось при трех температурных режимах (24 ± 2 °С, 30 ± 1 °С, 37 ± 1 °С). Через 24 – 48 ч определяли результат.

Для подтверждения роста колоний *Candida spp.* использовали среды Гисса с глюкозой, сахарозой, мальтозой, лактозой, маннитом, а также среду Кристенсена с мочевиной. Микробиологической петлей делали посев уколом в среду Гисса и штрихом по скошенной поверхности среды Кристенсена, инкубировали 24-28 часов при температуре 37 ± 1 °С. Также провели тест на образование ростковых (зародышевых) трубок (дифференциация *C. albicans* от других видов кандид). Для проведения теста необходима 24-часовая чистая культура. Для этого колонию с видимыми признаками рода *Candida* пересеяли в пробирку со средой Сабуро с левомицетином и термостатировали при температуре 37 ± 1 °С в течение 24 ч. Далее колонию 24-часовой культуры внесли в пробирку с 1,0 мл стерильной фетальной бычьей сывороткой и выдерживали в течение 3 ч при температуре 37 ± 1 °С. После инкубации проводилось микрокопирование.

Статистический анализ проводили методами вариационной статистики при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующим сравнением данных экспериментальных групп с группой контроля. Различия между исследованными группами признавались статистически достоверными при $p < 0,05$. Результаты представлены как средние арифметические \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Статистическая обработка проведена с использованием программы статистического анализа GraphPad Prism7.

Результаты и их обсуждение. Определение оптимальных условий культивирования производили по методике, описанной выше. После периода инкубации оценивали полученные данные.

При температуре 24 ± 2 °С рост на средах с посевов исходного разведения отсутствует.

При температуре 30 ± 1 °С через 24 часа рост отсутствует на среде Чапека и на МПА. При просмотре чашек со средами Сабуро, Сабуро с левомицетином и среде YPD с исходным разведением отмечается слабый рост, характерный для рода *Candida* – мелкие округлые блестящие выпуклые беловато-кремовые колонии сметанообразной консистенции. Через 48 часов на всех средах отмечается рост микроорганизмов. На среде Чапека очень мелкие беловатые колонии. На среде Сабуро, среде Сабуро с левомицетином, на МПА сливающиеся мелкие колонии белого цвета. На агаре YPD отмечается сильный рост выпуклых сливающихся колоний белого цвета.

При просмотре посевов с разведения для подсчета колоний приемлемый рост оказался на разведении 10^{-5} . Подсчет проводили также через 48 часов термостатирования. При этом отмечается небольшой рост посторонней микрофлоры.

При просмотре чашек при температурном режиме 37 ± 1 °С через 24 часа отмечается рост на всех средах. Через 48 часов на среде Чапека заметен равномерный рост мелких одинаковых колоний белого цвета. На среде Сабуро и среде Сабуро с левомицетином также отмечается рост мелких белых колоний по всей поверхности среды. На МПА заметен сплошной сливающийся рост колоний белого цвета, по краям роста отмечаются мелкие выпуклые колонии белого цвета. На среде YPD отмечается бурный рост крупных белых выпуклых колоний сметанообразной консистенции.

При просмотре посевов с разведения для подсчета колоний приемлемый рост оказался на разведении 10^{-5} . Подсчет проводили также через 48 часов инкубации. При этом отмечается небольшой рост посторонней микрофлоры. Результаты проведенного опыта можно увидеть на рисунке 1.

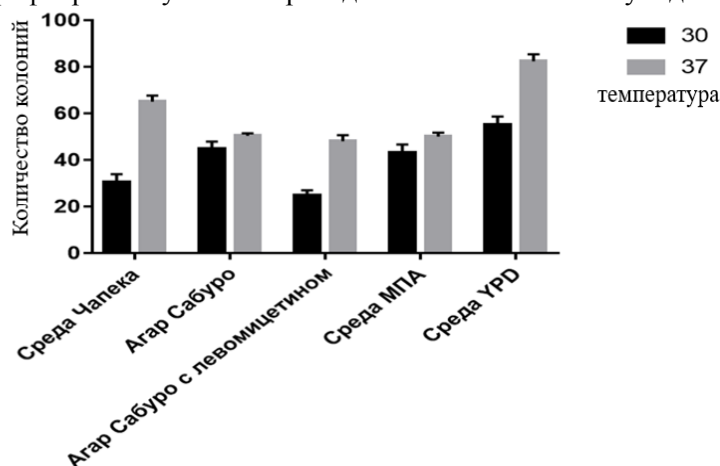


Рисунок 1. – Зависимость количества выросших колоний от температурного режима и типа питательной среды

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что наиболее подходящим температурным режимом является 37 °С, а оптимальной средой – YPD.

Для подтверждения роста колоний, характерных для *Candida spp.*, провели идентификацию культуры. Для этого были проведены биохимические тесты для определения сахаролитических свойств культуры (способность ферментировать глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, маннит), а также тест на уреазную активность. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица – Сахаролитические свойства и уреазная активность культуры *Candida*

Наименование среды	Результат через 48 ч
Среда Гисса с глюкозой	+
Среда Гисса с сахарозой	+
Среда Гисса с мальтозой	+
Среда Гисса с лактозой	0
Среда Гисса с маннитом	0
Среда Кристенсена с мочевиной	0

Примечание – результат позитивный - +, негативный – 0.

Суть данного метода заключается в том, что определенные сахара могут быть использованы культурой гриба в качестве источника углерода, а именно способность гриба сбраживать определенные сахара. Сравнивая полученные результаты с литературными данными, мы можем утверждать, что в наших исследованиях используется культура рода *Candida*.

Кроме того, был проведен тест на образование ростковых (зародышевых) трубок (дифференциация *C. albicans* от других видов кандид). После инкубации в термостате большую каплю содержимого пробирки поместили на предметное стекло и исследовали под микроскопом. Обнаружили образование дрожжевыми клетками филаментов – ростовых (зародышевых) трубок. Последние являются предшественниками истинных гиф, которые могут быть образованы только грибами рода *Candida albicans*. Для истинных герминантных трубок, образуемых *Candida albicans*, характерно отсутствие сужения в основании трубки, там, где она образуется из материнской клетки, что видно на рисунке 2.



Рисунок 2. – Ростковая трубка *C. albicans*

Основываясь на полученных результатах биохимических тестов и микроскопического анализа, можно утверждать, что был исследован рост культуры *Candida albicans*, а также определены оптимальные условия культивирования *Candida spp.*

Список использованных источников

1. Зверев, В.В. Основы микробиологии и иммунологии / В.В. Зверев, М.Н. Бойченко [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 368 с.
2. Покровский, В.И. Медицинская микробиология / В.И. Покровский, О.К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. – 1184 с.
3. Потекаев, Н.Н. Дерматология: Справочник практикующего врача / Н.Н. Потекаев. – Москва: «Литгерра», 2005. – 376 с.
4. Cannon, R.D. Oral colonization by *Candida albicans* / R.D. Cannon, W.L. Chaffin // Crit Rev Oral Biol – 1999. - № 10 (3). - 359-383 p.
5. Méar, J.-B. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: More than an opportunistic criminal association? / J.-B. Méar [и др.] // Médecine et Maladies Infectieuses. – 2013. - № 4 (43). – p. 146–151.
6. Yu, Z. Partial characterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin / Z. Yu, K.K. Zee, K. Ens, P.C. Doig, M.R. Carpenter, W. Staddon // Infect Immun. - 1994. - № 62 (7). – p. 2834-2842.