

Оценка возможности применения коммерческих питательных сред для выделения возбудителей особо опасных микозов из проб почвы

Н.В. Половец, А.В. Липницкий, Р.С. Суркова, О.А. Шергина, Д.В. Викторов, А.В. Топорков

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Волгоград, Россия

Evaluation of commercially available nutrient media for isolation of agents of endemic and invasive mycoses from soil samples

N.V. Polovets, A.V. Lipnitsky, R.S. Surkova, O.A. Shergina, D.V. Victorov, A.V. Toporkov

Federal Government Health Institution «Volograd Plague Control Research Institute» of Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia

Аннотация

Цель: провести оценку возможности применения коммерческих питательных сред для выделения возбудителей особо опасных микозов из почвы.

Материалы и методы: В эксперименте сравнивали три коммерческие сухие питательные среды фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия): агар Сабуро с глюкозой, агар Сабуро с глюкозой и хлорамфениколом, агар Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимином. В работе использовали культуры возбудителей особо опасных микозов (14 штаммов) из коллекции ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора и оппортунистических грибов (21 штамм) из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина.

Результаты исследования: Исследовали возможность применения агара Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимином в качестве селективной среды для выделения микромицетов II группы патогенности из проб почвы, загрязненной грибами и бактериями. Добавление в эту среду антибиотиков приводит к ингибированию роста бактерий и оппортунистических грибов, что повышает вероятность выделения культур возбудителей особо опасных микозов из проб почвы.

Заключение: В исследовании впервые установлено, что агар Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимином является эффективной селективной средой для выделения микромицетов II группы патогенности из почвы, загрязненной оппортунистическими грибами.

Ключевые слова

лабораторная микология, культивирование возбудителей, особо опасные микозы, инвазивные микозы

Summary

Objective: to evaluate the application of commercial nutrient media for the isolation of agents of particularly dangerous mycoses from soil.

Materials and methods: In experiments were compared three commercial dry media of HiMedia Laboratories Pvt. Limited (India): Sabouraud's agars with glucose; with glucose and chloramphenicol; with chloramphenicol and cycloheximide. Fourteen strains of dimorphic fungi, agents of endemic invasive mycoses from the collection of Volgograd Plague Control Research Institute as well as 21 strains of opportunistic fungi from collection of G.K. Skrjabin Institute of Biochemistry and Physiology were used.

Results of investigation: Possibilities of using of Sabouraud's agars with chloramphenicol and cycloheximide as a selective medium for isolation of micromycetes of II group of pathogenicity from soil's samples contaminated with fungi and bacteria were investigated. Addition to this medium of antibiotics results in inhibition of growth of bacteria and opportunistic fungi increasing feasibility of isolation of cultures of agents of particularly dangerous mycoses from soil's samples.

Conclusion: For the first time it was established that Sabouraud's agars dry medium with chloramphenicol and cycloheximide is the effective selective media for isolation of fungi of II group of pathogenicity from contaminated soil.

Keywords

mycology, fungal culture, endemic mycoses, dimorphic fungal pathogens, invasive mycoses, diagnostic methods

Введение

При исследовании проб в микологической лаборатории с целью выделения культур микромицетов II группы патогенности, до настоящего времени культуральный метод является обязательным. Одним из условий его эффективности является подбор питательных сред, различающихся по своему составу и назначению. [1]. В микологической практике наиболее востребованным и универсальным является агар Сабуро [2, 3]. В настоящее время все более широкое применение находят питательные среды с дифференциально-диагностическими свойствами [4]. Способность подавлять рост одних микроорганизмов и не оказывать влияния на ростовые свойства других микромицетов в данных средах достигается путем включения в их состав ряда компонентов. В среду Сабуро для подавления роста бактерий вводят антибиотики различной направленности. Наиболее известным и повсеместно применяемым в микологической практике антибиотиком, является хлорамфеникол (левомицетин) - синтетический антибиотик с антибактериальным и бактериостатическим действием в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, таких как *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, и многие другие.

Еще одним необходимым антибиотиком при выделении диморфных грибов из сильно загрязненного материала является циклогексимид (актидион) - фунгицид, который подавляет рост сапрофитических грибов, но в то же время не влияет на развитие диморфных грибов II группы патогенности [5].

На базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института действует Референс-центр по мониторингу за возбудителями особо опасных микозов. Проблема выделения возбудителей этих грибов из объектов внешней среды и клинического материала связана с тем, что микромицеты II группы патогенности отличаются более медленным ростом по сравнению с оппортунистическими микромицетами, содержание которых в объектах внешней среды, зачастую, превышает во много раз. Вследствие этого, выделение чистых культур возбудителей особо опасных микромицетов требует значительного времени.

Цель. Провести оценку возможности применения коммерческих питательных сред для выделения возбудителей особо опасных микозов из проб почвы.

Материалы и методы

В работе использовали коммерческие питательные среды фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). Были отобраны среды, широко применяемые в микологической практике: агар Сабуро с глюкозой (M063 Dextrose Agar), агар Сабуро с глюкозой и хлорамфениколом (M1067 Sabouraud Chloramphenicol), агар Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимидом (M664 Sabouraud Cycloheximide Chloramphenicol Agar).

В работе использовали культуры возбудителей особо опасных микозов из коллекции ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора - *Coccidioides posadasii* (3 штамма), *C. immitis* (3 штамма), *Histoplasma capsulatum var. capsulatum* (4 штамма), *H. capsulatum var. duboisii* (3 штамма) и *H. capsulatum var. farciminosum* (1 штамм).

Штаммы оппортунистических грибов, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, включали: *Paecilomyces variotti*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium culmorum* (2 штамма), *F. poae*, *F. sambucinum* (2 штамма), *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. graminearum* (2 штамма), *F. javanicum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Absidia hyalospora*, *Phialophora verrucosa*, *Malbranchea spp.*, *Geotrichum fermentans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*.

Взвеси микромицетов готовили в стерильном физиологическом растворе с последующим их высевом на агаровые среды по 0,1 мл. Пробирки инкубировали при температуре 27°C в течение 30 суток с ежедневным просмотром и фиксированием роста грибов.

Для имитации пробы почвы в пробирку добавляли 3 г нестерильной почвы и 3 мл стерильной дистиллированной воды, суспендировали и отбирали верхнюю фазу в пробирки по 0,9 мл. В эти пробирки добавляли по 0,1 мл взвеси культур микромицетов II группы патогенности до конечных концентраций от 1×10^3 до 1×10^5 КОЕ/мл. После перемешивания высеивали по 0,1 мл на пробирки с исследуемыми агаровыми средами.

Все работы с грибами проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» [6] и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» [7].

Результаты исследования

Проведено сравнительное исследование трех питательных сред, таких как стандартная среда Сабуро с глюкозой и двух ее модификации, включающих антибиотики, подавляющие рост бактерий и оппортунистических грибов. Всего использовали 35 штаммов микромицетов. Результаты фиксировали после ежедневного просмотра пробирок с посевами. Окончательные данные учета роста микромицетов на питательных средах представлены в таблице.

В течение первых трех суток на средах Сабуро с глюкозой, с глюкозой и хлорамфениколом выявлен рост колоний *Paecilomyces spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Absidia spp.*, *Phialophora spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Candida spp.* Зависимости скорости роста микромицетов от вида используемой питательной среды не наблюдали. В то же время у *Geotrichum spp.* и у *Malbranchea spp.* отмечены различия в скорости роста колоний. На агаре Сабуро с глюкозой, с глюкозой и хлорамфениколом колонии достигали размеров 1 см и более. На третий день наблюдений размер колоний не превышал 0,5 см. К 10 дню наблюдений размеры колоний сравнялись. Грибы, относящиеся к *Coccidioides spp.* и *Histoplasma spp.* различий в скорости роста в зависимости от агара не проявляли. На вышеперечисленных питательных средах первичный рост *Coccidioides spp.* был

заметен уже на 3-4 день, и, в зависимости от штамма, значительно увеличивалась площадь колоний в течение уже первой недели наблюдений. В то же время рост колоний *Histoplasma spp.* был заметен лишь на 4-5 сутки и оставался скудным на протяжении двух недель.

При учете роста грибов на агаре Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимидом получены иные результаты. Рост микромицетов *Paecilomyces spp.*, *Fusarium spp.*, *Cryptococcus spp.* не обнаружен на протяжении всего времени наблюдения. Слабый рост колоний *Geotrichum spp.* и *Candida spp.* был заметен начиная с 3 суток наблюдений и к 10 суткам зависимости размеров колоний от используемого агара уже не отмечено. Рост грибов *Penicillium spp.*, *Phialophora spp.*, и *Aspergillus spp.* в первые 3-4 суток не выявлен. Затем появились едва заметные колонии и к 10 суткам размеры культур достигли размеров, полученных на всех исследуемых средах. Различий в скорости роста *Coccidioides spp.* и *Histoplasma spp.* на агаре Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимидом, по сравнению с другими вариантами среды Сабуро не выявлено.

В экспериментах с пробами почвы учет роста колоний проводили ежедневно. Использовали штаммы *C.posadasii* М-11 и *H. capsulatum* 6651. Первоначальный обильный рост грибных колоний, преимущественно *Aspergillus spp.*, был зафиксирован в течение первых 2-3 суток на агаре

Таблица 1. Рост чистых культур грибов на питательных средах

Видовое название гриба	Агаровые питательные среды		
	Сабуро с глюкозой	Сабуро с глюкозой и хлорамфениколом	Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимидом
<i>C.immitis</i>	+	+	+
<i>C.posadasii</i>	+	+	+
<i>H. capsulatum var. capsulatum</i>	+	+	+
<i>H.capsulatum var. duboisii</i>	+	+	+
<i>H. capsulatum var. farciminosum</i>	+	+	+
<i>Paecilomyces variotti</i>	+	+	-
<i>Penicillium spp</i>	+	+	+/-
<i>A.fumigates</i>	+	+	+/-
<i>Fusarium spp</i>	+	+	-
<i>S. brevicaulis</i>	+	+	-
<i>Absidia hyalospora</i>	+	+	+
<i>Phialophora verrucosa</i>	+	+	+
<i>Malbranchea spp</i>	+	+	+
<i>Geotrichum fermentans</i>	+	+	+/-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	-
<i>Candida albicans</i>	+	+	+/-

+ наличие роста; +/- рост угнетен и замедлен; - отсутствие роста

Сабуро с глюкозой и хлорамфениколом. Начиная с 4-5 суток выявить колонии возбудителей особо опасных микозов не представлялось возможным из-за сливного роста грибов. В то же время на агаре Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимином рост колоний *C.posadasii* и *H.capsulatum* из проб почвы визуализировался в более поздние сроки. В 5 пробах из 20 также были обнаружены грибы *Aspergillus spp.*

Обсуждение результатов исследования

В своей работе мы провели сравнительную оценку различных питательных сред по характеру и скорости роста возбудителей особо опасных микозов и оппортунистических грибов.

В наших экспериментах мы использовали сухие стандартные микологические среды. Питательная среда Сабуро с глюкозой являлась контролем для поддержания всех штаммов микромицетов, находящиеся в коллекции референс-центра. В результате изучения данной среды все штаммы грибов образовывали типичные колонии в общепринятые сроки: 3-4 суток для возбудителей оппортунистических и до 10-20 суток для возбудителей особо опасных микозов. Таким образом данная среда отвечала всем требованиям роста грибов.

Внесение антибиотиков в микологические среды для подавления роста бактерий широко применяется на практике. Наиболее часто используемым антибиотиком является хлорамфеникол. Не оказывая влияния на ростовые свойства грибов, он способен подавлять рост сопутствующих бактериальных микроорганизмов. Это было подтверждено и в наших исследованиях. Скорость роста чистых культур микромицетов не различалась на агаре Сабуро как с добавлением хлорамфеникола, так без него.

Согласно данным, добавление в питательные среды циклогексимида подавляет рост оппортунистических микромицетов, не влияя на ростовые характеристики возбудителей особо опасных микозов. В нашей работе мы исследовали возможность применения агара Сабуро с хлорамфениколом и циклогексимином в качестве селективной среды для выделения микромицетов II группы патогенности из проб, контаминированных условно-патогенными грибами. При использовании среды с добавлением циклогексимида нами отмечено угнетение роста большинства микромицетов III-IV патогенности. Появление первичного роста колоний возбудителей оппортунистических и особо опасных микозов происходило в одни и те же сроки, что позволяет отсеять единичные колонии до начала спороношения и активного роста грибов на всей поверхности агара. Ингибирование скорости роста оппортунистических грибов позволяет повысить вероятность выделения культур возбудителей особо опасных микозов из проб почвы, однако полного подавления роста оппортунистических грибов не происходит.

Заключение

Использование сред, содержащих циклогексимида, для выделения возбудителей особо опасных микозов из проб, контаминированных условно-патогенными грибами, является необходимым. Тем не менее, целесообразно проведение дальнейших исследований по использованию питательных сред с повышенными концентрациями циклогексимида. Конечной целью, является определение концентрации циклогексимида, при которой происходит полное подавление роста оппортунистических грибов, но не культур возбудителей особо опасных грибов.

Литература

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. М.: ЗАО «Шико», 2013, 560 с.
2. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов: Пер. с англ. / под ред. Р.Ф. Куликовой. М.: Мир, 2001, 486 с.
3. Маркин А.М. Совершенствование идентификации возбудителей особо опасных микозов на основе молекулярно-генетических методов: канд. дис. Волгоград, 2016, 130 с.
4. Васильева Н.В., Елинов Н.В., Богомолова Т.С. и др. Микологические культуральные исследования: методические рекомендации. Санкт-Петербург, 2013, 56 с.
5. Антонов В.А., Липницкий А.В., Лесовой В.С. и др. Особо опасные микозы. Волгоград: Волга-Паблицер, 2013, 193 с.
6. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). СП 1.3.3118-13 от 28.11.2013 года N 64.
7. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08 от 28.01.2008 года N 4.