

Виділення пліснявих грибів

Плісняві гриби

Плісняві гриби (мікроскопічні гриби, мікроміцети) є організмами які постійно оточують людину. Вони повсюдно поширені у всіх наземних, прісноводних та морських середовищах і можуть майже на будь-яких об'єктах живої природи, технічних виробах і матеріалах, ґрунті та воді. Значна частина грибної колонії складається з мікроскопічних ниток (міцелію), які вкривають або пронизують субстрат. На грибному міцелію утворюються органи розмноження, які продукують мільйони спор діаметром 1-50 мкм. Вони легко переносяться потоками повітря, сприяючи поширенню грибів в просторі.



**Роман
Михалко,**

директор
Українського Наукового
Інституту Сертифікації

Мікроскопічні гриби у біотехнології

Мікроскопічні гриби широко застосовують у біотехнології. Вони є продуцентами антибіотиків, ферментів, органічних кислот, використовуються у процесах харчової промисловості. Однак деякі види при певних умовах можуть становити загрозу для здоров'я людини та викликати пошкодження промислових об'єктів, будівель та пам'яток архітектури.



**Андрій
Чуєнко,**

к.б.н., начальник
випробувальної
лабораторії Українського
Наукового Інституту
Сертифікації

ВАЖЛИВО!

Дослідження певних властивостей мікроскопічних грибів передбачає наявність у фахівця-міколога колекції або музею мікроміцетів. Для цього він має володіти різними методами їх виділення та ідентифікації (визначення на рівні виду або принаймні роду).

Методи класичної мікології передбачають виділення чистих грибних культур, спостереження за їх морфолого-культуральними ознаками,

мікроскопічне дослідження та подальшу ідентифікацію з використанням довідникових даних. **Зазвичай використання таких методів потребує мінімальну кількість недорогого обладнання, однак характеризується значним задіянням людського ресурсу та не відрізняється повною достовірністю.**

Роботи щодо виділення пліснявих грибів

Всі роботи щодо виділення пліснявих грибів проводять в стерильних приміщеннях — боксах. Стерильність досягається шляхом опромінення ультрафіолетовими лампами, обробки поверхонь дезінфекційними засобами, використання фільтрів грубої та тонкої очистки повітря та одноразових засобів індивідуального захисту персоналу (бахіл, рукавичок, халатів, шапочок та масок). Такі дії запобігають попаданню сторонніх мікроорганізмів в середовища для виділення і спотворенню результатів досліджень.

Рекомендовано проводити відбір на різні поживні середовища, такі як Чапека-Докса, картопляно-глюкозний агар (КГА), Сабуро, сусло-агар (4,5 та 6 градусів Балінга) та інші. Це пов'язано з особливостями росту різних видів мікроскопічних грибів та їх подальшої ідентифікації. Так представники родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* бажано виділяти та досліджувати на середовищі Чапека-Докса, оскільки вже на 2-3 добу відбувається формування спороносних структур за якими і проходить їх визначення до виду. При подальшому рості ці структури руйнуються, значно утруднюючи ідентифікацію. Щодо представників темнопігментованих видів *Alternaria*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Stachybotrys* – доцільніше використовувати середовище КГА або картопляно-морквяний агар (КМА).

ВАЖЛИВО!

Виділення грибів з повітря

Для виділення грибів з повітря найчастіше застосовують метод примусового осадження твердих частинок на чашку Петрі з заздалегідь підготовленим агаризованим поживним середовищем. Зазвичай для цього використовують пробовідбірники типу апарату Кротова, Тайфун Р-40 (100), ПУ-1Б. **Для більш точного підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) грибів в 1 м³ повітря необхідно відбирати не менше трьох проб повітря на кожне з середовищ.**

Виділення мікроміцетів з води

При виділенні мікроміцетів з води, будівельних матеріалів, харчових продуктів або субстратів, що мають ознаки сильної мікологічної контамінації

(видимі грибні колонії) слід застосовувати метод 10-кратних розведень. Тверді субстрати при цьому зважують, подрібнюють та готують водну суспензію іноді з додаванням поверхнево-активних речовин та антибіотиків. **Такий спосіб дозволяє не тільки виділити окремі види, але й визначити їх вміст, що дуже важливо при оцінці придатності харчових продуктів та кормів.**

Методи ідентифікації грибів

Часто застосовують **метод прямого переносу колоній на чашку Петрі** за допомогою препарувальної голки та метод відтисків. В останньому випадку готується стерильна печатка з поживним середовищем, яка притискається безпосередньо до ймовірного розташування плісняви.

Якщо в матеріалі передбачається наявність грибів відділу Zygomycota, таких як *Rhizopus* spp. та *Mucor* spp., які характеризуються надзвичайно високою швидкістю росту та утворенням значної кількості міцелію, необхідно використовувати **метод вологої камери**. Тобто поміщати досліджуваний матеріал в герметичну ємність на зволожений стерильний фільтрувальний папір при визначеній температурі та періодично контролювати появу колоній грибів.

ВАЖЛИВО!

При виділенні плісневих грибів, які належать до різних еколого-трофічних груп необхідно враховувати температуру культивування, концентрацію солей, потребу у специфічних джерелах живлення. Так, термофільні види швидше проростатимуть при температурах вище 40°C, психрофільні – нижче 20°C, галофільні – при високій концентрації хлориду натрію тощо.

Продукти певних ферментів можна виділяти на середовищах, які містять субстрати, щодо яких ці ферменти є специфічними.

Наприклад, гриби здатні утворювати целюлази можна виділити на живильному середовищі, яке містить подрібнений фільтрувальний папір, або бавовну, як єдине джерело вуглецю, види які утворюють ліпази – на середовищі з додаванням олії, види які утворюють протеази – на середовищі з додаванням подрібненої шкіри, волосся чи яєчного білку тощо.

Виділені та ідентифіковані грибні культури пересівають на спеціальні поживні середовища та зберігають при низьких температурах, періодично контролюючи їх фізіологічні властивості та чистоту.

Найбільш розповсюдженим молекулярно-біологічним методом є **полімеризація ланцюгової реакції (ПЛР)**. Суть методу полягає в ампліфікації видоспецифічних послідовностей ДНК в ході полімеразної ланцюгової реакції, коли окремі фрагменти ДНК, характерні лише для одного виду, вибірково син-

тезуються ферментом полімеразою. В подальшому фермент виявляється за допомогою електрофорезу в агаровому гелі. Слід відзначити, що використання методу ПЛР потребує дорогого обладнання, реактивів, а також попереднього вивчення різноманітності ДНК грибів.

Для фахівців медичної мікології окрім традиційних методів вкрай необхідно застосовувати новітні молекулярно-біологічні методи. Це пов'язано з їх високою швидкістю і точністю та може грати вирішальну роль при постановці діагнозу та призначенні подальшого лікування.

ВАЖЛИВО!

Специфічний характер реакції ПЛР дозволяє використовувати її безпосередньо на клінічних зразках, що містять велику кількість нуклеїнової кислоти хазяїна, без отримання чистих грибкових культур *in vitro*. На жаль, універсальним обмеженням ПЛР для діагностики грибків є загалом низька кількість ДНК грибка в клінічних зразках порівняно з вірусним або бактеріальним навантаженням. Це обмеження спонукало, зокрема, до пошуку варіацій для підвищення чутливості ПЛР. До них відносять ПЛР у реальному часі, петльову опосередковану ізотермічну ампліфікацію (LAMP), ампліфікацію на основі послідовності нуклеїнових кислот (NASBA), ампліфікацію по колу (RCA). Основними перевагами цього методу є здатність ампліфікувати мішені до понад 10⁹ копій, незначна потреба в оптимізації та стійкість до забруднень, що є основною проблемою для інших типів ПЛР. **Метод RCA** успішно використовувався для діагностики інфекцій, спричинених видами грибів родини Mucorales, видів *Cryptococcus* та *Exophiala*.

Серед інших методів молекулярно-біологічної ідентифікації мікроміцетів варто відмітити:

- **метод секвенування ДНК** (види *Aspergillus fumigatus*, *Candida parapsilosis*, *Scedosporium apiospermum*);
- **секвенування повного генома** (гриби ротової порожнини людини);
- **мас-спектрометрію MALDI-TOF** (види *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* та *Fusarium*, родина Mucorales, диморфні гриби *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* та рід *Coccidioides*, а також деякі дерматофіти);
- **флуоресцентну гібридизацію *in situ*** (FISH) (види родів *Aspergillus*, *Fusarium* і *Scedosporium*);
- **магнітний резонанс** (види роду *Candida*).

Виділення пліснявих або мікроскопічних грибів є комплексним завданням, що потребує задіяння фахівців з широкими знаннями у галузі мікології, молекулярної біології та медицини. А експериментальна база для проведення досліджень має являти собою сучасну мікробіологічну лабораторію, обладнану стерильними приміщеннями та іншим необхідним устаткуванням. ■

ВАЖЛИВО!