



УДК 582.251.62

ВИКОРИСТАННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ КРИТЕРІЇВ РОЗВИТКУ МІКРОМІЦЕТІВ ПІД ЧАС ОЦІНКИ ЯКОСТІ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ

ТЕТЯНА І. БОНДАР І ВІТА М. ТОКОВА

Анотація. Досліджено якість поживних середовищ після тривалого терміну зберігання сухих сумішей та приготованих середовищ КГА, Чапека, Сабуро за допомогою морфологічних критеріїв розвитку мікроміцетів.

Ключові слова: *Fusarium*, *Drechslera*, оцінка якості поживних середовищ, КГА, Чапек, Сабуро, мікроміцети

Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК НУБІП України, Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, Україна; phytopathology@quality.ua

Вступ

У сучасній практиці лабораторних досліджень, важливим є підтвердження належної якості матеріалів і реактивів, що використовуються під час випробовувань (ДСТУ ISO/IEC 17025:2006). У першу чергу це, звичайно, стосується лабораторій які акредитовані на відповідність вимогам ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 і зобов'язані виконувати такі вимоги, однак гарним тоном стало добровільне використання загальних настанов щодо ведення лабораторної практики, яке не лише зменшує можливість отримання хибних результатів, але й при поміркованому застосуванні полегшує життя дослідника.

У лабораторіях з мікробіологічним профілем під такий контроль якості підпадають поживні середовища, які були тут приготовані (ЕА-04/10; МУ 2.1.4-1057-01). Оцінка їх якості виконується за допомогою перевірки заздалегідь визначених характеристик: фізичних, біохімічних та біологічних. Останні – випробовуються із застосуванням тестових штамів. Однак враховуючи переважну більшість напрямків діяльності лабораторій саме у частині мікробіології яка охоплює бактеріальну флору, чи то контамінантів довкілля, або харчової та медичної сировини, або збудників

захворювань, всі методи були прописані із застосуванням бактеріальних тест-штамів (МУ 2.1.4-1057-01; МУК 4.2.2316-08; Методические рекомендации... 1980; Методические рекомендации... 1987). Враховуючи відмінності у біологічних характеристиках розвитку бактерій та грибів, постало питання яким чином оцінювати якість приготованих поживних середовищ, які використовуються у мікологічній та фітопатологічній практиці для неселективного вирощування мікроміцетів.

За основний показник біологічних властивостей поживних середовищ було використано швидкість росту та диференціюючи властивості (в даному випадку вплив на морфологію мікроміцету).

Метою досліджень було визначити придатність готових середовищ протягом тривалого терміну зберігання за умов кімнатної температури.

Матеріали і методи досліджень

У якості тест-штамів були обрані широко розповсюджені збудники хвороб рослин *Fusarium gibbosum* 11608, *F. sporotrichiella* 11606-1 та *Drechslera* sp. 11609, вилучені попередньо із зразків ґрунту та рослин. Тест-штами зберігаються у колекції мікроорганізмів сектору мікології

Табл. 1. Вплив терміну зберігання сухих середовищ на швидкість росту мікроміцетів.

Table 1. Influence of the preservation term of dry cultural media on growing temps of micromycetes.

Тест-культура	Швидкість росту тестових культур на середовищі Сабуро, мм			Швидкість росту тестових культур на середовищі Чапека, мм		
	Реактиви 0,5 року від дати виготовлення	Реактиви більше 3-х років від дати виготовлення	Затримка у рості, %	Реактиви 0,5 року від дати виготовлення	Реактиви більше 3-х років від дати виготовлення	Затримка у рості, %
<i>F. gibbosum</i> 11608	55,0	37,3	32,1	70,0	13,0	81,4
<i>F. sporotrichiella</i> 11606-1	61,3	54,3	11,4	65,0	10,0	84,6
<i>Drechslera</i> sp. 11609	32,7	20,0	38,8	31,7	11,3	64,2

Табл. 2. Вплив терміну зберігання приготованих середовищ на швидкість росту мікроміцетів.

Table 2. Influence of the preservation term of ready-to-use cultural media on growing temps of micromycetes.

Середовище	Час зберігання, міс	Затримка росту, відносно середньостатистичного діаметру колонії, %		
		<i>F. gibbosum</i> 11608	<i>F. sporotrichiella</i> 11606-1	<i>Drechslera</i> sp. 11609
КГА	12	31,7	12,2	н/в
	9	29,5	36,8	14,4
	7	10,9	19,7	15,0
	6	14,2	9,7	21,4
	3	7,1	13,2	1,0
Чапек	17	24,2	25,9	-14,3
	7	29,1	20,5	-40,0
	5	26,6	21,5	-47,6

та фітопатології і використовуються згідно правил поводження із референс-культурами. Перевіряли середовища, які найбільш часто застосовуються у фітопатологічній практиці: КГА (картопляно-глюкозний агар), середовище Чапека та середовище Сабуро. Всі вони зберігалися після автоклавування у щільно закупорених пластиковими корками скляних бутлях, протягом тривалого часу, у сухих стерильних умовах при +25°C.

Швидкість росту вимірювали у трьох повтореннях на п'яту добу і порівнювали із середньостатистичними даними. Для перевірки диференціюючих властивостей ми оцінювали на 7-му добу типовість морфологічних характеристик росту грибів: зовнішній вигляд колонії, її щільність та колір, наявність пігменту, утворення спораношення та інших структур, їх

інтенсивність та зовнішній вигляд.

Термін зберігання коливався від 3 до 17 місяців, коливання температури протягом цього періоду не перевищувало 3°C. За таких умов у 100% випадків збереглася стерильність середовища, втрати ваги середовища через випаровування вологи становили від 0,5 до 1,5% за півроку.

Результати та їх обговорення

Згідно нормативної документації (ЕА-04/10; МУК 4.2.2316-08) придатність сухих поживних середовищ можна продовжити після закінчення терміну зберігання, перевіривши їх якість. В таких випадках порівняння ростових характеристик тест-штамів виявилось достатнім (Табл. 1).

Затримка у рості при приготуванні

Табл. 3. Вплив терміну зберігання приготованих середовищ на морфологічні характеристики розвитку мікроміцетів.
Table 3. Influence of the preservation term of ready-to-use cultural media on morphological features of micromycetes development.

Середовище	Час зберігання, міс	Щільність колонії, бал/наявність пігменту/морфологія конідій		
		<i>F. gibbosum</i> 11608	<i>F. sporotrichiella</i> 11606-1	<i>Drechslera</i> sp. 11609
КГА	12	2/-/спородохії відсутні	2/-/типові	2/+/розділ на сектори, конідії типові
	9	3/+ / спородохії світлі	3/+/типові	3/+/типові
	7	2/+ / спородохії світлі	3/+/грушевидні	2/+/типові
	6	3/+ / спородохії світлі	3/+/типові	3/+/типові
	3	3/+ / спородохії світлі	2/+/типові	3/+/типові
Чапек	17	2/-/спородохії світлі, конідії мають відмерлі клітини	2/-	3/+/типові
	7	1/-/спородохії світлі	2/-/круглі з носиком	3/+/типові
	5	3/+ / спородохії лососеві/конідії мають вкраплення жиру	3/+	3/+/типові

середовищ із застосуванням реактивів, через три роки від дати виготовлення, коливалась від 11,4% до 38,8% на середовищі Сабуро і досягала 84,6% на середовищі Чапека. Отже сухе середовище Чапека є придатним в коротший термін і є більш вимогливим щодо дотримання терміну придатності, очевидно це пов'язано із складом середовища, куди входять на відміну від середовища Сабуро лише хімічні елементи, які менш стійкі до змін навколишнього середовища.

При проведенні оцінки придатності приготованих середовищ, які зберігалися у кімнатних умовах, було виявлено, що кожні три місяці зберігання середовища КГА призводять до затримки росту мікроміцетів у середньому на 10% (Табл. 2). Так, перші три місяці затримка росту становила від 1,0% до 7,1%, наступні три місяці – вже від 9,7% до 21,4%, а ще через три місяці – була у межах від 14,4% до 36,8%. Слід врахувати, що КГА готується із природних речовин (картопля) нестабільного складу, які з періодом вегетаційного сезону можуть змінювати вміст поживних речовин, що відповідно впливає на ростові показники мікроміцетів. З іншого боку, для середовища із сталим хімічних складом (Чапек) зміни у рості мікроміцетів не залежали від терміну зберігання (різниця дослідних варіантів у межах похибки) і в середньому становили 20% для грибів роду *Fusarium*, в той час як *Drechslera* sp. навпаки

мали вищу швидкість росту майже на 40%. Очевидно це пояснюється переходом певних хімічних речовин у більш доступні для мікроміцета сполуки і не залежить від виду стратегії росту (Табл. 2). Морфологічні характеристики *Drechslera* sp. 11609: щільність колонії, наявність пігменту, інтенсивність спороношення та морфологія конідій залишалися незмінними.

Суттєвих змін у морфології грибів при вирощуванні їх на середовищах із різними термінами зберігання не відмічено, що дає можливість ідентифікувати ізоляти вирощені на таких середовищах за приналежністю до роду, однак коли постає питання ідентифікації ізолятів до виду, будь-які зміни у морфології, зокрема конідій, може призвести до хибного визначення. Так, наприклад, через рік зберігання КГА досліджуваний ізолят *F. gibbosum* 11608 не утворював спородохії, а отже макроконідії мали менший розмір та кількість перегородок порівняно із типовими конідіями, разом із *F. sporotrichiella* 11606-1 ці ізоляти не утворювали властивий їм пігмент на реверзмі, щільність їх колонії зменшилась, а у *Drechslera* sp. 11609 спостерігався розподіл на сектори. Як раніше зазначалось, мали вплив на морфологічні показники і сезонні зміни природнього субстрату. Так, КГА із терміном зберігання 6 та 7 місяців були приготовані із різних зборів картоплі, що вплинуло на зовнішній

вигляд мікроконідій *F. sporotrichiella* 11606-1, які стали більш грушеподібними порівняно із округлими типовими, а щільність колоній *F. gibbosum* 11608 та *Drechslera* sp. 11609 зменшилась.

Незважаючи на відсутність змін у швидкості росту грибів роду *Fusarium*, як зазначалося вище (Табл. 2), зміни у розвитку грибів все ж таки спостерігалися, про що свідчать морфологічні характеристики (Табл. 3). Так *F. gibbosum* 11608 із часом зберігання середовища не лише втрачає колір спородохій, але й типову пігментацію реверзума, щільність колоній, а конідії вже на сьомий день мають відмерлі клітини. *F. sporotrichiella* 11606-1 утворює менш щільні колонії і мікроконідії втрачають типовий зовнішній вигляд – стають зовсім круглими з невиразним носиком. Морфологічні зміни у *Drechslera* sp. 11609, як ми зазначали раніше, не спостерігались, очевидно цей ізолят є толерантним до складу поживних середовищ.

Висновки

Таким чином залежно від призначення середовища для оцінки його якості можна застосовувати наступні критерії: середовища для вилучення мікроміцетів – швидкість росту колонії, а середовища для ідентифікації мікроміцетів мають бути перевірені за критеріями – швидкість росту колонії, щільність колонії, наявність пігменту, інтенсивність утворення та морфологія конідій.

Поживні середовища приготовані із сухих сумішей після закінчення терміну придатності можуть призводити до затримки

росту мікроміцетів від 32,1% до 84,6%.

Приготовані середовища Чапека при зберіганні у сухому приміщенні за температури +25°C затримують ріст досліджуваних штамів на 20% лише через півроку і з часом не змінюються. КГА затримує ріст на 10% кожні 3 місяці зберігання. Обидва середовища можуть бути використані протягом щонайменше півроку після приготування для простих робіт із вилучення грибів із різноманітних субстратів.

Враховуючи вплив на морфологічні характеристики мікроміцетів, які є важливим критерієм під час їх ідентифікації, бажано для визначення видової приналежності грибів застосовувати свіжо приготовані середовища, а для робіт із ідентифікації грибів до роду можна використовувати середовища із терміном зберігання не більше трьох місяців.

Використані джерела

- ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій.
- ЕА-04/10. Акредитація мікробіологічних лабораторій.
- МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ К КОНТРОЛЮ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ 1980. Москва.
- МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ "ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРОКОВ ГОДНОСТИ СУХИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД И ПИТАТЕЛЬНЫХ ОСНОВ МЕТОДОМ "УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ" ПРИ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ" 1987. Махачкала.
- МУ 2.1.4-1057-01. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды.
- МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания.

APPLICATION OF MORPHOLOGICAL CRITERIA OF MICROMYCETES DEVELOPMENT FOR ESTIMATION OF QUALITY OF CULTURAL MEDIA

TETYANA I. BONDAR & VITA M. TOKOVA

Abstract. The quality of such cultural media as PDA, Chapek and Saburo was investigated after long term preservation in dry and ready-to-use conditions on the base of morphological criteria of micromycetes.

Key words: *Fusarium*, *Drechslera*, quality of cultural media, PDA, Chapek, Saburo, micromycetes

Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Products of APC NUBIP of Ukraine, Heroyiv Oboroni str. 15, 03041 Kyiv, Ukraine; phytopathology@quality.ua