

УДК 619:579.22

## СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА И РАЗМНОЖЕНИЯ ДЕРМАТОФИТОВ

**\*Алешкевич В.Н., \*Медведев А.П., \*\*Кулешов Д.Б.**\*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

\*\*ОАО «БелВитунифарм», г. Витебск, Республика Беларусь

В статье приведены результаты влияния некоторых углеводов в составе питательных сред на рост и размножение патогенных дерматофитов. **Ключевые слова:** дерматофиты, мицелий, культура, колонии, среды, микроконидии, макроконидии, стимуляторы, хламидоспоры, рост, размножение, углеводы.

## STIMULATION OF GROWTH AND REPRODUCTION OF DERMATOPHYTES

**\*Aleshkevich V.N., Medvedev A.P., \*\*Kuleshov D.B.**

\*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

\*\*OJCM «BelVitunipharm», Vitebsk, Republic of Belarus

The article features the data on the influence of some carbohydrates in media on growth and reproduction of pathogenic dermatophytes. **Keywords:** dermatophytes, mycelium, culture, colonies, media, microconidia, macroconidia, stimulants, chlamydospores, growth, reproduction, carbohydrates.

**Введение.** Дерматофиты – микроскопические грибы, которые способны вызывать инфекционные болезни животных и человека под общим названием дерматофитозы, проявляющиеся поражением кожного покрова [7, 8, 12, 15].

Самым действенным способом профилактики этих болезней является вакцинация. Для приготовления вакцин в производственных условиях выращивание дерматофитов с целью получения биомассы грибов осуществляют на среде Сабуро, на сусло-агаре, среде Чапека, солодовом сусле и других средах. Специалисты биопредприятий заинтересованы в процессе культивирования дерматофитов получать максимально возможное количество биомассы, предназначенной для приготовления вакцин, при минимальных производственных затратах [4, 5, 10, 11].

Необходимо отметить, что культивирование микроорганизмов имеет большое значение в производстве средств специфической профилактики инфекционных болезней животных, т.к. на этом технологическом этапе происходит синтез антигенов, необходимых для изготовления высокоэффективных препаратов [13, 16].

Микроорганизмам для осуществления своей жизнедеятельности необходимы, в первую очередь, такие элементы, как С, О, Н, N, P, Са, К, Mg, Fe. Пожалуй, самыми важными для бактерий являются С и N. Источником азота для микроорганизмов служат различные азотсодержащие соединения. Для подавляющего большинства гетеротрофных микроорганизмов, к которым относят и дерматофитов, легкодоступными источниками углерода и энергии служат углеводы [17, 18, 19].

Для стимуляции роста и размножения различных видов бактерий используют многие ингредиенты: сыворотку крови животных, витамины, дрожжевой экстракт, аминокислоты–2, холин и другие стимулирующие вещества, которые добавляют в питательные среды. Известно, что с целью обогащения питательных сред углеродом и стимуляции роста микроорганизмов применяют глюкозу, лактозу, мальтозу и другие сахара.

С учетом вышеотмеченного, целью нашей работы явилось определение влияния различных углеводов на рост, размножение и спорогенность культур дерматофитов *Tr. verrucosum*, *Tr. mentagraphytes*, *M. canis*, *M. gypseum*.

**Материалы и методы исследований.** Для опытов использовали культуру грибов родов *Trichophyton* и *Microsporium*. В качестве питательной среды применяли сусло-агар и агар Сабуро. Для приготовления сусло-агара обычное сусло с пивоваренного завода, содержащее 10–15% сахара, разбавляли в 2 раза водопроводной водой, фильтровали, добавляли 2% агара, стерилизовали при 1 атм. 30 минут. Среду Сабуро готовили следующим образом. На 1 литр водопроводной воды брали 80 г прессованных пекарских дрожжей, кипятили 15 минут, фильтровали через бумажный фильтр, расфасовывали во флаконы и стерилизовали при 0,5 атм 20 минут. К 100 см<sup>3</sup> стерильной дрожжевой воды добавляли 1% пептона, 4% глюкозы, 2% агара, нагревали до растворения агара, стерилизовали при 0,5 атм 20 минут [2, 4, 8].

В простерилизованные питательные среды добавляли порошки углеводов в количестве 0,5 г/см<sup>3</sup> среды. Питательные среды с углеводами стерилизовали в щадящем режиме, т.е. при 0,5 атм в течение 15 минут, а затем расфасовывали их в стерильные матровые колбы по 210 см<sup>3</sup>, пробирки по 6–8 см<sup>3</sup> и чашки Петри по 12–15 см<sup>3</sup>. В опытах использовали среды, в которые были добавлены следующие углеводы: глюкоза, фруктоза, мальтоза, лактоза, рамноза, манноза, сорбит, галактоза, раффиноза, ксилоза, инулин, сахароза, арабиноза, дульцит, целлобиоза, сорбоза. В качестве контроля служили питательные среды без добавления углеводов.

Для опытов брали 7–14-суточную культуру грибов и засеивали в матровые колбы, пробирки с питательной средой высевали взвесь культуры на физиологическом растворе с рН 6,4–6,8, а в чашки Петри – кусочки культуры, снятой с поверхности сусло-агара. Выращивали грибы в течение 28 суток при 26–28С°.

Начиная с 6–7-го дня, через каждые 3–7 дней, пробирки, чашки Петри, матровые колбы с опытными и контрольными средами просматривали, обращая внимание на характер роста грибов. Определяли диаметр выросших колоний, их форму, консистенцию, учитывали цвет колоний, форму края и другие признаки.

Спустя 14 суток после выдерживания сред в термостате, колбы с выросшей культурой добавляли 50–100 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора, в пробирке - 5 см<sup>3</sup> и грибным скребком снимали биомассу, смешивая ее с физраствором. Взвесь культуры в количестве 1 см<sup>3</sup> помещали в стерильную пробирку и добавляли от 9 до 24 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора. В зависимости от первоначальной концентрации грибной суспензии ее дополнительно разбавляли еще в 5–10 раз. Затем в камере Горяева в поле зрения микроскопа под увеличением  $\times 40$  подсчитывали количество микроконидий в разбавленной грибной суспензии. Полученный результат умножали на степень разведения грибной взвеси [9].

**Результаты исследований.** При просмотре пробирок с питательной средой, засеянных культурами дерматофитов, было установлено, что фруктоза, глюкоза, мальтоза, манноза, целлобиоза, сорбит влияли на рост и развитие микроскопических грибов и изменяли пигментацию косяка, а инулин, дульцит и особенно ксилоза задерживали развитие культур. Такие углеводы, как галактоза, рамноза, сахароза, арабиноза, оказывали слабое действие на рост и изменение пигментации культур. Действительно, к 14-му дню культуры, засеянные на питательную среду с фруктозой или глюкозой, изменяли среду до темно-вишневого цвета, а в пробирках с добавками сахарозы и арабинозы среда была светло-розовой. В пробирках с добавлением в среду ксилозы, инулина и дульцита роста грибов не наблюдали, и среда оставалась светло-серой в течение всего срока выращивания культур.

В пробирках с добавлением раффинозы хорошо росли культуры *Tr. verrucosum*. Напротив, рост грибов рода *Microsporium* в пробирках даже к 28-му дню с этим углеводом был незначительным, и диаметр колоний колебался от 2 до 3 мм. В чашках Петри рост также был малоинтенсивным, диаметр колоний не превышал 6 мм. Такая же картина роста наблюдалась на сусло-агаре в матровых колбах, что свидетельствует об отсутствии стимулирующего влияния раффинозы на рост грибов. Только на среде Сабуро формировались колонии размером от 18 до 21 мм, что объясняется стимулирующим влиянием на энергию роста грибов глюкозой, которая входит в состав среды.

У культур *Tr. verrucosum* после 14-дневного выращивания на среде с добавлением фруктозы, глюкозы, целлобиозы, несмотря на хороший рост, при микроскопии обнаружили утолщенный, вздутый, стареющий, с жировыми включениями мицелий с незначительным количеством макро- и микроконидий. В пробирках и чашках Петри с добавлением в питательную среду мальтозы, несмотря на слабый рост, при микроскопии наблюдали септированный молодой мицелий с большим количеством микроконидий. Особенно это было заметно при микроскопии 21-дневных культур. При микроскопии культур, выросших на среде с добавлением фруктозы, мы находили вздутый мицелий с большим количеством хламидоспор и небольшим количеством макроконидий. На питательной среде с добавлением мальтозы при незначительном диаметре колоний (2–3 мм) наблюдали большое количество тонкого септированного мицелия и огромное количество свободных микроконидий. На питательных средах с добавлением других углеводов, засеянных культурами *Tr. verrucosum*, отличий от роста на контрольных средах замечено не было.

Рост культур *Tr. mentagraphytes*, *M. canis*, *M. gypseum* на средах с добавлением углеводов характеризовался следующими особенностями.

В пробирках на питательных средах с добавлением фруктозы, глюкозы, маннозы и целлобиозы грибы *Tr. mentagraphytes* формировали к 7-му дню выращивания белые пушистые колонии, а к 15-му дню колонии покрывали весь косяк пробирки. В чашках Петри на среде с упомянутыми углеводами колонии гриба к 14-му дню достигали диаметра 35–36 мм. При микроскопии культуры с добавлением фруктозы и глюкозы наблюдали появление большого количества септированного мицелия. На питательной среде с добавлением целлобиозы размер колоний достигал 15–16 мм в диаметре, а с добавками других углеводов - не более 7 мм.

У культур *M. canis* видимый рост в пробирках с фруктозой, глюкозой, мальтозой наблюдали на 10-й день в виде плотных колоний с радиальной исчерченностью. Пигментация среды в пробирках с фруктозой была светло-красной, а культур *Trichophyton* – темно-вишневой.

У культур *M. canis* на питательных средах с добавлением фруктозы, глюкозы, маннозы на 21-й день роста наблюдали при микроскопии стареющий вздутый мицелий, а с добавкой мальтозы – тонкий извитый мицелий с обилием микроконидий и незначительным количеством хламидоспор и макроконидий.

При просмотре препаратов из культур *M. canis*, выращенных на питательных средах с добавлением фруктозы, глюкозы, маннозы и целлобиозы, на 21-й день роста наблюдали стареющий, с крупной зернистостью, вздутый, сильно сегментированный мицелий с концевыми хламидоспорами и большим количеством макроконидий. При просмотре препаратов культур, выросших на среде с добавлением мальтозы и, особенно сорбозы, обнаруживали тонкий ветвящийся мицелий с большим количеством микро- и макроконидий.

На питательной среде с добавлением сорбита активно развивалась культура *M. gypseum*. На поверхности среды к 14-му дню выращивания формировались желтоватого цвета колонии диаметром до 12 мм, а к 28-му дню – до 20 мм. В пробирках, в чашках Петри с добавлением фруктозы, глюкозы, мальтозы, сорбита пигментация питательных сред с культурами *M. gypseum* была оранжевой. При микроскопии препаратов, приготовленных из культур, выросших на средах с мальтозой, фруктозой, глюкозой, наблюдали толстый стареющий мицелий с хламидоспорами, а в препаратах из культур, выросших на средах с добавлением сорбита – молодой, тонкий мицелий с большим количеством микроконидий. При просмотре препаратов, приготовленных из культур, выросших на средах с добавлением ксилозы, инулина, дульцита в поле зрения микроскопа видели обрывки тонкого септированного мицелия, при полном отсутствии остальных элементов гриба – хламидоспор, микро- и макроконидий. При микроскопии препаратов из культур, выросших на пита-

тельных средах с добавлением рамнозы, сахарозы, арабинозы, наблюдали тонкий септированный мицелий и небольшое количество микро- и макроконидий.

Нами было замечено, что из всех 16 испытанных углеводов лишь фруктоза, глюкоза, мальтоза, манноза наиболее благоприятно влияли на рост и развитие культур дерматофитов родов *Trichophyton* и *Microsporum*. К тому же более высокой ростобеспечивающей способностью обладал сусло-агар. В чашках Петри на сусло-агаре с добавлением фруктозы вырастили колонии диаметром 27–32 мм, мальтозы – 48–52 мм, маннозы – 25–28 мм, глюкозы – 27–29 мм, а на среде без углеводов – 20–23 мм. При микроскопии препаратов грибов, выросших на среде в пробирках, в чашках Петри и колбах с мальтозой, обнаруживали тонкий сегментированный мицелий и большое количество микроконидий. Так, концентрация микроконидий (млн/см<sup>3</sup>) при выращивании грибов в колбах на сусло-агаре с фруктозой составила 79,8±2,1, глюкозой – 57,7±3,1, маннозой – 43,2±2,3, с мальтозой – 107,3±2,2, а при культивировании в чашках Петри – 22±2,1; 18,6±1,1; 17,4±2,1; 28,5±1,1; соответственно. При выращивании дерматофитов в пробирках концентрация микроконидий на сусло-агаре с фруктозой составила (млн/см<sup>3</sup>) 20±2,1; с глюкозой – 16,6±2,1, с маннозой – 15,1±1,1; с мальтозой – 26±1,1. Эти данные показывают, что наиболее интенсивно стимулирует рост и размножение дерматофитов мальтоза.

**Заключение.** В процессе опытной работы установлено, что хорошо стимулировали рост и размножение *Tr. verrucosum* - раффиноза, *Tr. mentagraphytes* – целлобиоза, *M. canis* – сорбоза, *M. gypseum* – сорбит. На рост, развитие, размножение и спорогенность культур дерматофитов благоприятно влияли фруктоза, глюкоза, мальтоза, манноза. Из названных углеводов особенно активно стимулировала рост и размножение грибов *Tr. verrucosum* мальтоза. Наиболее интенсивный рост этих грибов отмечен на 14-е сутки на сусло-агаре, а максимальная концентрация микроконидий установлена на 21-й день выращивания, т.е. добавление в среду мальтозы повышает спорогенез *Tr. verrucosum*.

Результаты опытной работы позволяют заключить, что из 16 испытанных нами углеводов практический интерес представляют целлобиоза, сорбоза, сорбит, раффиноза, глюкоза, манноза, мальтоза, которые могут быть использованы в качестве стимулирующих добавок в питательные среды, предназначенные для выращивания микроскопических грибов и накопления биомассы при производстве вакцин для профилактики дерматофитозов.

**Литература.** Алешкевич, В. Н. К вопросу о трихофитии крупного рогатого скота / В. Н. Алешкевич, В. С. Прудников, Н. И. Лабусова // Ученые Записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины. – 2000. – Т. 36, № 1. – С. 6–7. 2. Алешкевич, В. Н. Методические указания по лабораторной диагностике дерматофитозов животных / В. Н. Алешкевич, В. С. Прудников. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 18 с. 3. Вербицкий, А. А. Питательные среды и культивирование микроорганизмов / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 236 с. 4. Кашкин, П. Н. Медицинская микология / П. Н. Кашкин. – Ленинград : Медгиз, 1962. – 344 с. 5. Костин, В. В. Словарь ветеринарных микологических и микотоксикологических терминов / В. В. Костин. – Москва : Россельхозиздат, 1987. – 79 с. 6. Кузнецов, А. Ф. Ветеринарная микология : учебное пособие / А. Ф. Кузнецов. – Санкт-Петербург, 1997. – 71 с. 7. Кузнецов, А. Ф. Ветеринарная микология / А. Ф. Кузнецов. – Санкт-Петербург : Лань, 2001. – 416 с. 8. Лизак, Ю. В. Метод определения целлюлозной активности у почвенных гидромицетов / Ю. В. Лизак, В. С. Сиверс, И. В. Алексеева // Микробиологические и биохимические исследования почв. – Москва, 1971. – С. 116–117. 9. Меджидов, М. М. Справочник по микробиологическим питательным средам / М. М. Меджидов. – Москва, 2003. – 86 с. 10. Методы диагностики болезней животных : практическое пособие / А. П. Курдео [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2005. – 166 с. 11. Нетрусов, А. И. Микробиология : учебник для студентов вузов, обучающихся по направлению подготовки бакалавра «Биология» и биологическим специальностям / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – 2-е изд., стер. – Москва : Академия, 2007. – 352 с. 12. Поляк, М. С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М. С. Поляк, В. И. Сухаревич, М. Э. Сухаревич. – Санкт-Петербург : ЭЛБИ-СПб., 2008. – 352 с. 13. Саркисов, А. Х. Диагностика грибных болезней животных / А. Х. Саркисов, В. П. Королева, Е. С. Квашина. – Москва : Колос, 1971. – 143 с. 14. Саркисов, А. Х. Микотоксины / А. Х. Саркисов. – Москва : Сельхозизд, 1954. – 215 с. 15. Семенов, С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов / С. М. Семенов – Москва, 1990. – 240 с. 16. Семенов, С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов / С. М. Семенов. – Москва, 1990. – 240 с. 17. Петрович, С. В. Микозы животных / С. В. Петрович. – Москва : Росагропромиздат, 1989. – 174 с. 18. Харченко, С. Н. Справочник по микозам и микотоксикозам сельскохозяйственных животных / С. Н. Харченко, В. П. Литвин, И. М. Тарабара. – Киев : Урожай, 1982. – 168 с.

Статья передана в печать 27.03.2018 г.

УДК 619:617.57/58:636.1

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРОФЛОРЫ К ПРЕПАРАТАМ ПРОПОЛИСА ПРИ БОЛЕЗНЯХ КОПЫТЕЦ

Сольяничук П.В., Руколь В.М., Ходас В.А., Борисик Р.Н., Контурова Д.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

Применение продуктов пчеловодства в животноводстве позволит решить ряд важных задач, связанных с регулированием кишечного микробиоценоза, иммунной, гормональной и ферментативной систем организма животных. Преимущество их в том, что они безвредны и не имеют недостатков, присущих антибиотикам и химиотерапевтическим средствам. В ветеринарной хирургии препараты на основе прополиса используются в