

SAT-LB-P-2-BFT(R)-11

PAINTING WITH YEASTS ON CHROMOGENIC DIFFERENTIAL CULTURE MEDIA

Assoc. Prof. Sevdalina Todorova, PhD

Department of Biotechnologies and Food Technologies,
“Angel Kanchev” University of Ruse, Razgrad Branch, Bulgaria
Phone: +359882692828
E-mail: stodorova@uni-ruse.bg

B.Eng. Neli Atanasova, Master Student

B.Eng. Mirela Atanasova, Master Student

Department of Chemical Technologies,
“Angel Kanchev” University of Ruse, Razgrad Branch, Bulgaria
E-mail: kondor7680@abv.bg, miramar01@abv.bg

***Abstract:** Arts-related science activities provide unique opportunities to engage students' strengths. Microbial art, or agar art, is artwork created by culturing microorganisms in certain patterns. Agar plates are used as a canvas, while pigmented bacteria and yeasts represent the paint. Chromogenic media are frequently used in direct and rapid identification of yeasts because different species produce unique colors on these media. This study was thus undertaken to investigate the ability (or inability) of some *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Endomyces* and *Kluyveromyces* species to grow on chromogenic yeast culture medium - HiCrome™ *Candida* Differential Agar. Living works of art on agar plates were created by “painting” with yeasts that express various colors in chromogenic medium. The intensity of growth and the characteristic pigmentation of each of the studied species yeasts were determined.*

***Keywords:** Microbial art, Agar art, Painting, Yeasts, Chromogenic differential media.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Връзката на микробиологията с изкуството дава възможност за визуализация и комуникация на науката, а също и за различен вид научно творчество на студентите. Прилагането на „микробното изкуство“ (microbio art), а именно рисуване с живи микроорганизми върху агарова среда, включва иновативни задачи, които да направят дисциплината по-атрактивна, да стимулират студентите за още по-задълбочени познания и да ги насърчат да мислят извън границите на даден обект (Todorova, S., Dimitrov, T., Ivanova, I., Muradov, H., Spiridonova, R., Nedelcheva, R., Nedelcheva, R., Stefanova, P., & Petrova, D., 2015).

Микроорганизмите с пигментите, които синтезират, са „живите бои“ за цветните рисунки. За направа на различните изображения, картини, рисунки, освен „живи бои“, е необходимо и „платно“. „Платното“ са различните агарови хранителни среди.

Най-голям ефект постигаме при рисуване с дрожди на хромогенни хранителни среди.

Хромогенните хранителни среди са диференциално – диагностични среди от ново поколение, които позволяват бързо откриване и идентифициране на микроорганизмите. Това става възможно с помощта на хромогенни и флуорогенни съставки, включени в състава на хранителните среди. Хромогенните хранителни среди ни позволяват да открием специфични ензимни активности, характерни за отделна група или даже за отделен вид микроорганизъм.

Принцип на действие:

Микроорганизмите се идентифицират чрез ензимни реакции, които са специфични за вида им. Изследваният микроорганизъм съдържа ензим, който метаболизира безцветния хромогенен субстрат, като се образува специфично оцветен реакционен продукт.

Хромогенната среда променя цвета си (или флуоресцира) или колонииите на съответния микроорганизъм се оцветяват в характерен за него цвят.

Това проучване е предприето за изследване на способността (или неспособността) на някои видове *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Endomyces* и *Kluveromyces* да растат върху хромогенна среда за култивиране на дрожди - HiCrome™ *Candida* Differential Agar. Определя се интензивността на растежа и характерната пигментация на всеки от изследваните видове дрожди. Чрез рисуване с дрождите, които изразяват различни цветове в хромогенната среда, се създават живите произведения на микробното изкуството върху агар. Крайният резултат е впечатляващ и запомнящ се и много малко хора могат да кажат, че са го правили.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Дрожди

Дрождите са едноклетъчни гъби. Те са безхлорофилни, неподвижни, еукариотни микроорганизми.

Използвани са следните видове дрожди от колекцията на катедра „Биотехнологии и хранителни технологии“ във филиал Разград на Русенски университет „Ангел Кънчев“:

Saccharomyces cerevisiae - хлебните дрожди са едни от най-изучаваните в микробиологията. Развиват се в среди, съдържащи въглехидрати и причиняват алкохолна ферментация. Човекът използва тези организми от хиляди години в производството на хляб, вино, бира.

Candida utilis, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra* – се използват в получаването на микробиален белтък.

Candida albicans – могат да причинят кандидози.

Saccharomycodes Ludwigii – могат да причинят развала на хранителни продукти, по-специално на сулфитирани ферментирани напитки, като вино, сайдер.

Endomyces magnusii – гъбите от сем. *Endomycetaceae* нямат практическа стойност.

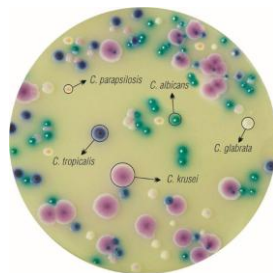
Kluveromyces tara - изследвани са за потенциална употреба в биотехнологични производства, като на биогорива, едноклетъчни протеини, ензими и др.

Дрождите се съхраняват при 0-4 °C в епруветки на наклонен агар на Сабуро.

Хромогенни хранителни среди

Богата палитра от различно оцветени дрожди се получава най-вече на хромогенни диференциални среди. Тези среди са предназначени за директна и бърза идентификация на дрождите, тъй като различните видове, най-вече *Candida*, произвеждат уникални цветове върху тях и лесно се разграничават помежду си. От друга страна многообразието от цветове прави хромогенните среди много подходящи за микробното изкуство при рисуване с дрожди.

HiCrome™ *Candida* Differential Agar дава възможност за селективна изолация и директна идентификация на дрождите от р. *Candida*. Хромогенният агент в средата позволява колонииите на всеки вид да прорастват и да се оцветяват в характерния за него цвят (Фиг.1) (<https://ridacom.com/en/products/view/5016>).

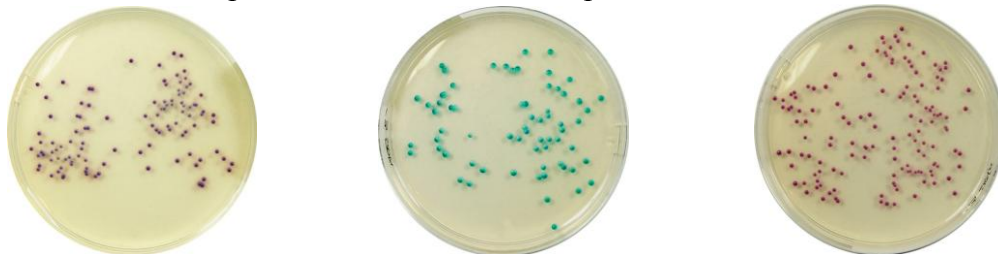


Фиг. 1. Различни видове *Candida* на HiCrome™ агар с характерно оцветяване на колонииите: *C. albicans* – зелен цвят; *C. tropicalis* – стоманено синьо до синьо; *C. krusei* – лилав цвят; *C. glabrata* – кремав до бял; *C. parapsilosis* - кремави колонии, подобни на *C. glabrata*

Цветовете на колонии на HiCrome агар трябва да се определят след 48 h (Shettar, S. K., Patil, A. B., Nadagir, S. D., Shepur, T. A., Mythri, B. A., & Gadavar, S., 2012).

PP3010 – Colorex™ Candida

Тази среда е разработена с цел опростяване на изолацията и предполагаемото идентифициране на някои видове дрожди. Външният вид и диференциацията на *Candida sp.* е очевиден от отличителните цветове на колонии (Фиг. 2) (<http://www.eolabs.com/product/pp3010-colorex-candida/>). На тази среда единствено *C. glabrata* дава различно оцветяване в сравнение с HiCrome™ агар.



C. tropicalis → метално сини

C. albicans → зелени

C. glabrata → лилави

Фиг. 2. Характерно оцветяване на колонии на видове *Candida* върху PP3010 – Colorex™ Candida

CHROMagar™ Candida

CHROMagar Candida е диференциална хромогенна среда, предназначена да идентифицира *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. krusei* по цветовете и морфологични различия на колонии им. Колонии на *C. albicans* са зелени; колонии от *C. tropicalis* изглеждат тъмносини до метално сини; *C. krusei* имат розови колонии с белезникава граница. Други дрожди могат да развият светло- до тъмнолилави или кремави цветове (например, *C. glabrata*), според литературния източник (Ozcan, K., Ikit, M., Ates, A., Turac-Bicer, A., & Demirhindi, H., 2010).

HardyCHROM™ Candida

Хромогенна селективна среда, препоръчителна за изолиране и диференциране на дрожди. Различията в морфологията и цвета на колонии на тази среда позволява диференцирането на *C. albicans*, *C. tropicalis* и *C. krusei*. Съгласно литературния източник (https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/HardyCHROMCandida.html):

C. albicans – образува средноголеми, гладки, зелени до тъмно метало-зелени колонии за 48 h. Колонии изглеждат светложелени след 24 h.

C. tropicalis – след 48 h колонии са средноголеми, гладки, сини до тъмносини с метален блясък, със син ореол. След 24 h колонии изглеждат сини до синьо-розови.

C. glabrata - средно големи, гладки, розови колонии, често с по-тъмно сиволилав център.

Други видове дрожди, например *C. parapsilosis*, обикновено имат малки, бели до розови колонии.

Candida ID chromogenic medium (CAID)

Тази среда е за идентифициране на *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Candida lusitanae*, *Candida kefyr* и *Candida guilliermondii*. На CAID *C. albicans* има синьо оцветяване на колонии, за разлика от зеленото оцветяване на горепосочените хромогенни среди. Синият цвят е интензивен след 24 h култивиране върху средата. Колонии на *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitanae* и *C. guilliermondii* са розови и блестящи в рамките на 48 h. С изключение на два вида *Candida famata* и *Rhodotorula sp.*, другите изолирани видове дрожди са бели на CAID (Letscher-Bru, V., Meyer, M. H., Galois, A. C., Waller, J., & Candolfi, E., 2002). Авторите не са наблюдавали оцветяване на изолати *C. glabrata* и *S. cerevisiae*. Други автори (Fricker-Hidalgo,

Н., Orenга, S., Lebeau, B., Pelloux, H., Brenier-Pinchart, M. P., Ambroise-Thomas, P., & Grillot, R., 2001) докладват розова пигментация на някои щамове за видове *Candida sphaerica*, *Candida pelliculosa*, *C. utilis*, *C. glabrata* и *S. cerevisiae*.

Никерсон Агар Vi.G.G.Y. (Nickerson Medium)

Диференцирането на дрождите в тази среда се основава на способността им да редуцират бисмутов хидроксид полисулфит. Доказано е, че най-силна редуцираща способност проявяват *C. albicans*, *C. krusei* и *C. tropicalis*. В кисела или неутрална среда, те образуват черни колонии, поради образуването на бисмутов сулфид (<http://www.himedialabs.ru/m217-m217d>).

C. albicans – колонии гладки, кръгли, кафяво-черни, без блясък, без дифузия на цвета в околната среда;

C. tropicalis – колонии гладки, тъмнокафяви с черни центрове, с блясък, дифузно затъмняване на средата след 72 часа.

ВЛ хранителен агар (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar)

Тази среда е разработена от Green и Gray през 1950 г. Създаден е нов вариант с бромкрезол зелено, присъстващ в средата като оцветител и придаващ ѝ зелен цвят. Дрождите *Saccharomyces* поемат багрилото от средата и обикновено не го метаболизират, така че колонии им се оцветяват в зелено, а агаровата среда става бистра, непрозрачна. *Brettanomyces sp.* поемат бромкрезол зеленото, но е наблюдавано, че метаболизират багрилото. Затова техните колонии са с жълтеникав, белезникав цвят (<http://brettanomycesproject.com/2009/03/wln-agar-medium/>).

Агар арт

За създаване на уникалните рисунки с дрожди е използван хромогенен агар за *Candida* - HiCrome™. Предварително е предприето изследване на способността (или неспособността) на проучваните от нас видове *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Endomyces* и *Kluveromyces* да растат върху хромогенната среда за култивиране на дрожди - HiCrome™ *Candida* Differential Agar и определихме характерното им оцветяване. В нашето изследване при *C. albicans* (зелен цвят) и *C. tropicalis* (тъмносин цвят) (Фиг. 3) оцветяването напълно съвпада с дадената за средата характеристика на видовете (<https://ridacom.com/en/products/view/5016>). В литературата не открихме цветово описание на *C. utilis* на хромогенен агар за *Candida* - HiCrome™. Но на среда *Candida* ID, някои щамове от вида образуват розови колонии (Letscher-Bru V, Meyer MH, Galois AC, Waller J, Candolfi E. J Clin Microbiol. 2002 Apr; 40(4):1508-10.). В нашето проучване установихме, че при хидролизиране на хромогенните субстанции, този вид образува светлолилави колонии (Фиг. 3), различаващи се ясно от останалите два вида.



C. albicans



C. tropicalis



C. utilis

Фиг. 3. Оцветяване на видове *Candida* в проведеното изследване на HiCrome™ *Candida* Differential Agar

Видовете *Rhodotorula* се характеризират с производството на каротеноидни пигменти в оранжево-червен цвят. Bellanger, A.-P., Grenouillet, F., François, N., Skana, F., & Millon, L. (2013) установяват, че два изолата *Rhodotorula* spp. не успяват да растат в субкултура върху хромогенна среда за дрожди и да образуват характерното оцветяване. Освен това две от четири налични в търговската мрежа хромогенни среди за дрожди са показали значителен инхибиторен ефект върху растежа на видовете *Rhodotorula*. Willinger, B., Hillowoth, C., Selitsch, B. & Manafi, M. (2001) докладват за *Rhodotorula mucilaginosa*, растящи като розови

колонии на среда Candida ID. В нашето изследване *R. rubra* имаше много добър растеж на HiCrome™ Candida Differential Agar в типичното оранжево-червено оцветяване.

S. cerevisiae на Candida ID растат като бели незабележими колонии (Willinger, B., Hillowoth, C., Selitsch, B. & Manafi, M., 2001). В нашето изследване те имат тъмно розово оцветяване (Фиг. 4 (1)). *E. magnussii* също се оцветяват в тъмно розово (Фиг. 4 (2)), но имат по-сух и по-плътен растеж.



Фиг. 4. Оцветяване на *S. cerevisiae* (1) и *E. magnussii* (2) в HiCrome™ Candida Differential Agar

K. mara образува големи, бели до кремави колонии с розов център (Фиг. 5 (1)), а *S. Ludwigii* растат много слабо, с малки, бели, незабележими колонии (Фиг. 5 (2)).



Фиг. 5. Оцветяване на *K. mara* (1) и *S. Ludwigii* (2) в HiCrome™ Candida Differential Agar

При рисуване върху Хромогенен агар за Candida - HiCrome™ петритата трябва да се инкубират в продължение най-малко на 48 часа, за да се постигне адекватно цветово развитие на дрождите. Цветовете се засилват с възрастта. И когато дрождите са посяти в рисунък, се получава нещо красиво и радващо окото, което много малко хора могат да кажат, че са прави (Фиг. 6, 7 и 8).



Фиг. 6. Рисунка с *C. tropicalis*, *R. rubra*, *S. cerevisiae* и *K. mara* на HiCrome™ Candida Differential Agar от Мирела Атанасова



Фиг. 7. Рисунка с *C. albicans*, *C. utilis* и *C. tropicalis* на HiCrome™ Candida Differential Agar от Нели Атанасова



Фиг. 8. Рисунки с *C. albicans*, *C. utilis*, *C. tropicalis* и *K. mara* на HiCrome™ Candida Differential Agar от Севдалина Годорова

ИЗВОДИ

Хромогенните среди дават възможност откриването и идентифицирането на микроорганизмите да става лесно, бързо и надеждно.

Хромогенните субстрати, включени в агара, се хидролизират от специфичните ензими на дрождите, което води до характерното оцветяване на различните видове дрожди и прави нашите рисунки многоцветни.

За първи път е определено оцветяването и растежа на видове *C. utilis*, *R. rubra*, *E. magnussii*, *S. Ludwigii*, *K. mara* на HiCrome™ Candida Differential Agar.

Интензитетът и специфичността на цветовете са ясни и характерни и се засилват с възрастта.

Благодарност:

Настоящата работата се финансира от Фонд научни изследвания към Русенски университет „Ангел Кънчев“, договор № 2018-ПУ-09 на тема: „Подкрепа на иновативни форми за работа на професионалните клубове в Русенски университет „Ангел Кънчев“.

REFERENCES

Bellanger, A.-P., Grenouillet, F., François, N., Skana, F., & Millon, L. (2013). Inhibitory effect of chromogenic culture media on the growth of *Rhodotorula*: relevance to the diagnosis of *Rhodotorula* spp. infections. *APMIS*, 121(11), 1109-1117, First published: 12 June 2013.

Fricke-Hidalgo, H., Orenga, S., Lebeau, B., Pelloux, H., Brenier-Pinchart, M. P., Ambroise-Thomas, P., & Grillot, R. (2001). Evaluation of Candida ID, a New Chromogenic Medium for Fungal Isolation and Preliminary Identification of Some Yeast Species. *J Clin Microbiol*, 39(4), 1647-1649.

Letscher-Bru, V., Meyer, M. H., Galois, A. C., Waller, J., & Candolfi, E. (2002). Prospective evaluation of the new chromogenic medium Candida ID, in comparison with Candiselect, for isolation of molds and isolation and presumptive identification of yeast species. *J Clin Microbiol*, 40(4), 1508-10.

Ozcan, K., Ilkit, M., Ates, A., Turac-Bicer, A., & Demirhindi, H. (2010). Performance of Chromogenic Candida Agar and CHROMagar Candida in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Medical Mycology*, 48(1), 29-34.

Shettar, S. K., Patil, A. B., Nadagir, S. D., Shepur, T. A., Mythri, B. A., & Gadavar, S. (2012). Evaluation of HiCrome differential agar for speciation of candida. *Journal of Academy of Medical Sciences*, 2(3), 101-104.

Todorova, S., Dimitrov, T., Ivanova, I., Muradov, H., Spiridonova, R., Nedelcheva, R., Nedelcheva, R., Stefanova, P., & Petrova, D. (2015). Innovations in teaching and learning microbiology – painting with pigment microorganisms. *University of Ruse “Angel Kanchev” Proceedings*, 54(10.2), 73-79.

Willinger, B., Hillowoth, C., Selitsch, B. & Manafi, M. (2001). Performance of Candida ID, a New Chromogenic Medium for Presumptive Identification of Candida Species, in Comparison to CHROMagar Candida. *J. Clin. Microbiol.*, 39(10), 3793-3795.

Wu, R., Brinkema, C., Peterson, M., Waltzer, A., & Chowning, J. (2018). STEAM Connections: Painting with Bacteria. *The American Biology Teacher*, 80(4), 305-307. DOI: 10.1525/abt.2018.80.4.305

<http://brettanomycesproject.com/2009/03/wln-agar-medium/>

https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/HardyCHROMCandida.html

<https://ridacom.com/en/products/view/5016>

<http://www.eolabs.com/product/pp3010-colorex-candida/>