

## Izolovanje mikrogljiva roda *Candida* iz usne duplje čoveka i ispitivanje uticaja kofeina na njihov rast

*Iz humane bukalne sluzokože izolovana su sledeća četiri soja iz roda Candida: Candida albicans, Candida krusei, Candida parapsilosis i Candida sp. Nakon izolacije i postizanja čiste kulture, ispitivan je uticaj kofeina na ove mikrogljive. Sojevi su tretirani sa tri različite koncentracije kofeina (0.1%, 0.2%, 0.5%). Istraživanje je pokazalo da kofein deluje inhibitorno na rast gljive Candida albicans, dok na rast sojeva Candida krusei, Candida parapsilosis i Candida sp. kofein deluje pospešujuće. Za ispitivanje uticaja većih koncentracija kofeina na gljive iz roda Candida potrebno je izvršiti dalja istraživanja.*

### Uvod

Većina gljiva iz roda *Candida* su fakultativno patogene. One se kao pripadnice normalne mikroflore tela čoveka nalaze u usnoj duplji, u respiratornom, digestivnom i genitalnom traktu, kao i na koži čoveka (Karakašević 1989). U određenim uslovima sredine *Candida* raste brže i postaje patogena (Campbell i Reece 2005). Gljive iz ovog roda izazivaju gljivično oboljenje kandidijazu (Tan *et al.* 2003), a kao najčešći uzročnik ovog oboljenja navodi se vrsta *Candida albicans* (Karakašević 1989). Međutim, tokom poslednje decenije sve je veći broj slučajeva gde se kao uzročnici oboljenja javljaju tzv. non-albicans vrste: *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* (Georgiev 2003; Win *et al.* 2006). Jedan od tipova kandidijaze je oralna kandidijaza. Gljive uzročnici oralne kandidijaze često dolaze u kontakt sa kofeinom preko namirnica

koje čovek koristi u svakodnevnoj ishrani kao što su kafa, čaj, čokolada i gazirani napici.

Kofein se prirodno nalazi u semenu kafe, lišću čaja i semenu kakaovca. Kofein se takođe koristi i kao dodatak gaziranim pićima (Smith *et al.* 2007). Deluje unutar nervnih ćelija čoveka ubrzavajući njihov metabolizam (Milić 2005), povećava dejstvo analgetika, stimuliše rad centralnog nervnog sistema i povećava budnost ljudskog organizma (Ramanavičiene *et al.* 2003a i 2003b; Smith *et al.* 2007), a utiče i na povećanje krvnog pritiska čoveka (Nurminen *et al.* 1999). Kofein ublažava neželjena dejstva uzrokovana stresom (Lieberman *et al.* 2002) i nije štetan za ljudski organizam ukoliko se dnevno ne unosi više od 150–250 mg ove supstance, dok u većim količinama može izazvati različite poremećaje, a letalna doza za čoveka iznosi 10 g (Noller 1973).

Pokazano je i antibakterijsko dejstvo kofeina. Ovaj alkaloid deluje inhibitorno na rast bakterija kao što su *Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens* (Ramanavičiene *et al.* 2003b). Polazna hipoteza ovog istraživanja je da će kofein delovati inhibitorno i na rast mikrogljiva iz roda *Candida*.

**Cilj** ovog istraživanja je izolovanje što većeg broja sojeva gljiva roda *Candida* iz usne duplje čoveka, kao i ispitivanje uticaja kofeina na rast ovih gljiva. Poznavanje efekta kofeina na pomenute gljivice moglo bi doprineti efikasnijem i bržem lečenju kandidijaze.

### Materijal i metode

#### Izolovanje mikrogljiva iz roda *Candida*

Sterilnim štapićima za bris uzeti su brisevi usnih duplji pet polaznika programa biologije u Istraživačkoj stanici Petnica prvog dana istraživanja i brisevi drugih pet polaznika drugog dana. Brisevi su zasejani u LB podlogu (recept podloge prema Kne-

*Nikola Pantić (1993), Ljubovija, Vojvode Mišića 2, učenik 2. razreda SŠ „Vuk Karadžić” u Ljuboviji*

*MENTOR: Jelena Savić, dipl. biolog*

žević-Vukčević i Simić 1997) i ostavljeni na inkubaciju od 48 sati na temperaturi od 32°C. Na inkubaciju je takođe ostavljena i kontrolna epruveta sa LB podlogom radi provere sterilnosti. Epruvete sa zasejanim prekonocnim kulturama su bile zamucenije u odnosu na podlogu u kontrolnoj epruveti koja je ostala bistra. Na selektivnoj podlozi *Candida Brilliance Agar* (proizvođača Oxoid Ltd) izolovane su čiste kulture gljivica metodom iscrpljivanja (Knežević-Vukčević i Simić 1997). Petrijeve šolje sa zasejanim kulturama stavljene su u termostat na inkubaciju od 48 sati. Determinacija izolovanih sojeva izvršena je na osnovu boje sojeva na *Candida Brilliance Agar* podlozi (prema uputstvu proizvođača na <http://www.oxoid.com>). Različite boje potiču od homogene smeše koja ulazi u sastav selektivne *Candida Brilliance Agar* podloge.

### Tretiranje izolovanih gljiva kofeinom

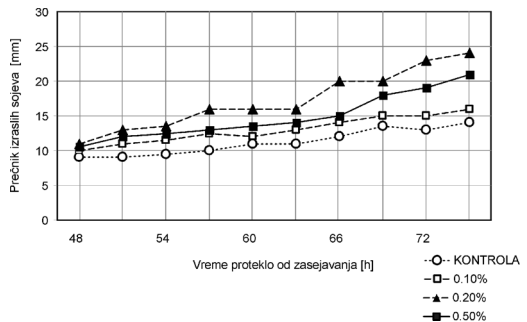
Ispitivan je uticaj 0.1%, 0.2% i 0.5% rastvora kofeina na rast izolovanih sojeva *Candida*. Rastvori su pravljeni u sterilnoj destilovanoj vodi. U 16 epruveta sipana je LB podloga. U prve četiri epruvete dodat je 0.1% rastvor kofeina, u naredne četiri 0.2% rastvor kofeina i u sledeće četiri 0.5% rastvor kofeina. U preostale četiri epruvete sa LB podlogom, koje služe kao negativna kontrola u eksperimentu, dodata je sterilna destilovana voda. Zatim su prethodno dobijena četiri soja presejana u LB podloge sa različitim koncentracijama kofeina, po jedan soj u svaku koncentraciju i kontrolnu epruvetu sa destilovanom vodom. Epruvete sa zasejanim kulturama stavljene su na inkubaciju u termostat na 48 sati. Nakon inkubacije kulture su presejane u Petri šolje sa sladnim agarom (proizvođač: Institut za imunologiju i virusologiju Torlak) tako što je eza sa zahvaćenom kulturom zabadana u podlogu. Svako zasejavanje je ponovljeno po dva puta. Petrijeve šolje ostavljene su na inkubaciju i posle 48 sati očitavani prvi rezultati. Nakon toga, očitavanje rezultata vršeno je još četiri puta, na svakih šest sati.

### Rezultati i diskusija

Uspešno su izolovana četiri različita soja iz roda *Candida* i uzgojene njihove čiste kulture. Determinacija je izvršena na osnovu boje sojeva na selektivnoj podlozi: *Candida albicans* se obojila zeleno, *Candida krusei* ružičasto, *Candida parapsilosis*

braon, a *Candida* sp. plavo. Rezultati su navedeni i diskutovani prema dejstvu na pojedinačne sojeve izolovanih gljiva. Kofein nije sprečio rast nijednog soja *Candida* (slike 1–4).

Kod soja *Candida albicans* najmanji porast zabeležen je pri 0.5% kofeina u podlozi (slika 1). Najveći prečnik meren posle 48 h zabeležen je u grupi koja nije tretirana kofeinom: opseg prečnika bio je od 10.5 do 15 mm prilikom prvog zasejavanja i 11.5–15 mm pri ponavljanju. Sa porastom koncentracije kofeina, smanjuje se prečnik kolonija. Prečnik kolonija pri 0.5% kofeina u podlozi nakon 48 h bio je u opsegu od 8–10.5 mm, odnosno u opsegu od 6.5–10.5 mm kod drugog zasejavanja. U poslednjem merenju, razlika između kontrolnog soja i soja tretiranog 0.5% kofeinom bila je 4.5 mm. Može se zaključiti da je kofein delovao inhibitory na rast soja *Candida albicans*.

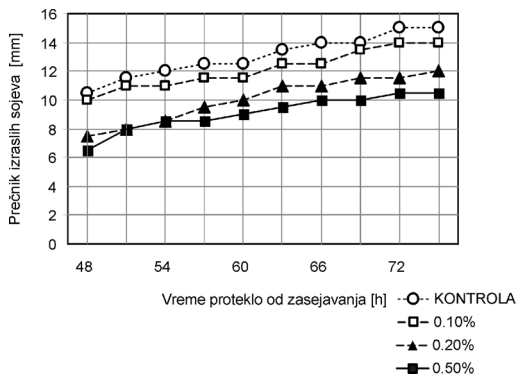


Slika 1. Prečnici izraslih kolonija *Candida albicans*

Figure 1. Diameters of *Candida albicans* colonies, from control to 0.50%

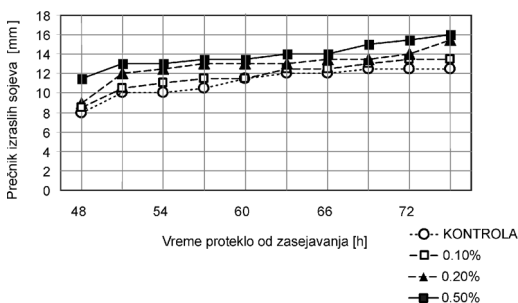
Na rast soja *Candida krusei* kofein je delovao stimulatивно – najveći porast kolonija zabeležen kod sojeva u čije podloge je dodat 0.5% rastvor kofeina (slika 2), a najmanji u kontrolnoj grupi. Razlika između ove dve grupe pri poslednjem merenju bila je 3.5 mm.

I na rast soja *Candida parapsilosis* kofein je delovao pospešujuće (slika 3). Najveći porast kolonija zabeležen je na podlogama sa 0.5% rastvorom kofeina: prečnik kolonija je bio 13.5 mm, odnosno 15.5 mm, pri poslednjem merenju. Razlike između prečnika ove i kontrolne grupe na kraju eksperimenta bile su 3 odnosno 3.5 mm.



Slika 2. Prečnici izraslih kolonija *Candida krusei*

Figure 2. Diameters of *Candida krusei* colonies, from control to 0.50%

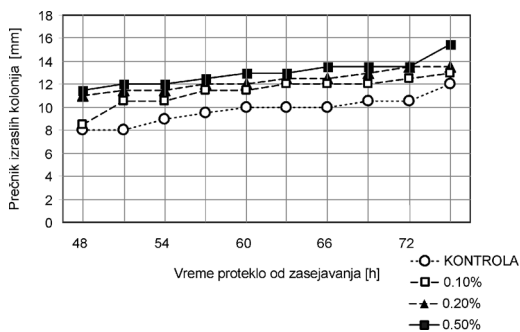


Slika 3. Prečnici izraslih kolonija *Candida parapsilosis*

Figure 3. Diameters of *Candida parapsilosis* colonies, from control to 0.50%

Najmanji prečnici kod soja *Candida sp.* takođe su izmereni kod onih kultura koje nisu tretirane kofeinom. Prečnika kolonija pri poslednjem merenju bio je 14 mm kod prvog ponavljanja, odnosno 13 mm kod drugog. Najveći porast zabeležen je u Petrijevim šoljama sa dodatim 0.2% rastvorom kofeina. Prečnici kolonija u ovim Petrijevim šoljama na kraju eksperimenta bili su 24 mm, odnosno 23 mm.

Iako ovim eksperimentom nije utvrđivan mehanizam dejstva kofeina na tretirane sojeve mikrogljiva, inhibitorski efekat na rast soja *Candida albicans* mogao bi se objasniti povećanjem pH podloge – ovaj soj najbolje raste na podlogama čiji je pH niži



Slika 4. Prečnici izraslih kolonija *Candida sp.*

Figure 4. Diameters of *Candida sp.* colonies, from control to 0.50%

od osam (Anaissie *et al.* 2009), ili direktnim antimikotskim dejstvom. Kako je kofein derivat purina i ima sličnosti sa bazama koje ulaze u sastav DNK (Sterner 2010), može se pretpostaviti da sojevi *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* i *Candida sp.* uspešno prevode kofein u purinske baze i na taj način ubrzavaju rast i deobu ćelija. Međutim kako je kod *Candida sp.* porast bio veći kod sojeva tretiranih 0.2% rastvorom kofeina od onih koji su tretirani 0.5% rastvorom može se zaključiti da kofein deluje pospešujuće na ove sojeve samo do određene koncentracije.

## Zaključak

Kofein je delovao inhibitorski na rast gljive *Candida albicans*, koja je najčešći uzročnik gljivičnog oboljenja kandidijaza. Sa druge strane, delovao je stimulatивно na rast mikrogljiva *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* i *Candida sp.* Kod gljive *Candida sp.* porast sojeva koji su tretirani 0.5% rastvorom kofeina bio je manji u odnosu na one koje su tretirane 0.2% rastvorom. U daljim istraživanjima ova tri soja, trebalo bi utvrditi efekat koncentrovanih rastvora kofeina.

## Literatura

Anaissie E., McGinnis M., Pfaller M. 2009. *Clinical mycology*. Oxford: Elsevier Health Sciences

Campbell N., Reece J. 2005. *Biology*. New York: Pearson

Georgiev V. 2003. *Opportunistic infections: treatment and prophylaxis*. Totowa: Humana Press

Karakašević B. 1989. *Mikrobiologija i parazitologija*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga

Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji, prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Lieberman H., Tharion W., Shukitt-Hale B., Speckman K., Tulley R. 2002. Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U. S. Navy SEAL training. *Psychopharmacology*, **164**: 250.

Milić B. 2005. *Halucinogene supstance*. Novi Sad: Prometej

Noller 1973. *Kemija organskih spojeva*. Zagreb: Tehnička knjiga

Nurminen M. L., Niittynen L., Korpela R., Vapaatalo H. 1999. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *European Journal of Clinical Nutrition*, **53**: 831.

Ramanavičiene A., Ačaite J., Dringeliene A., Markevičius A., Ramanavičius A. 2003a. Effect of Caffeine on Mouse Immunocompetent Cells. *Acta medica Lituanica*, **10**: 86.

Ramanavičiene A., Mostovojus V., Bachmatova I., Ramanacičius A. 2003b. Anti-bacterial effect of Caffeine on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Acta medica Lituanica*, **10**: 185.

Samaranayake L. 2006. *Essential microbiology for dentistry*. Oxford: Elsevier health sciences

Smith B., Gupta U., Gupta B. 2007. *Caffeine and activation theory: effects on health and behavior*. CRC Press

Sterner O. 2010. *Chemistry, Health and Environment*. Weinheim: Wiley-VCH

Tan J., Salata R., Tan M. 2003. *Infectious diseases*. Philadelphia: American College of Physicians

Win W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. 2006. *Konemans's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins

www.oxid.com. Dehydrated culture media.

Dostupno na:

[http://www.oxid.com-/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1002&c=UK&lang=EN](http://www.oxid.com-/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1002&c=UK&lang=EN)

---

*Nikola Pantić*

## Isolation of *Candida* Microfungi from the Human Oral Cavity and the Effect of Caffeine on Their Growth

The following four *Candida* strains were isolated from the human oral cavity: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida* sp. The effect of caffeine was investigated on the isolated strains. The strains were treated with three different concentrations of caffeine (0.1%, 0.2%, 0.5%). The research shows that caffeine has an inhibitory effect on the growth of the fungus *Candida albicans*, while having a positive effect on the growth of other strains. Further research should be performed in order to better understand the effect of higher concentrations of caffeine on the *Candida* fungi. 