

Грибы, бактерии и водорастворимые полисахаридные соединения в пыли помещений

Ахапкина И. Г., канд. биол. наук, Антропова А. Б., Желтикова Т. М., доктор биол. наук, НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова. РАМН, 105064, Москва, пер. Малый Казенный, 5а

При попадании в помещения значительная часть микроорганизмов становится элементом наполнения бытовой пыли. Поэтому она является наиболее удачным объектом для выявления возможной корреляции между общей бактериальной обсемененностью, концентрацией микромицетов и концентрацией полисахаридных соединений (ПС), способных индуцировать неоднозначный иммунный ответ макроорганизма. В результате проведенного исследования было показано, что содержание ПС в образцах пыли колебалось в пределах от 0,3 до 96 мкг/г пыли, при этом увеличение количества ПС в домашней пыли связано с повышением встречаемости в образцах грамотрицательных палочковидных бактерий. Прямой корреляции между содержанием ПС и общей бактериальной обсемененностью, концентрацией мицелиальных грибов в пыли не было выявлено. Содержание микробов в пыли составляло от 2×10^3 до 1×10^9 НВЧК/г пыли. Концентрация грибов – $1,7 \times 10^3$ – $3,7 \times 10^5$ КОЕ/г пыли.

Ключевые слова: полисахариды, бактерии, мицелиальные грибы, окружающая среда, домашняя пыль, гиперчувствительность.

Комфортность жизни людей с проявлениями гиперчувствительности во многом зависит от насыщенности окружающей среды различными негативными факторами, способными провоцировать ухудшение состояния здоровья. К таковым, вероятно, следует отнести полисахаридные соединения (ПС). Естественными источниками ПС в природных сообществах являются микроорганизмы: микромицеты и бактерии. Большой интерес вызывают элементы строения клеточных стенок микроорганизмов полисахаридной природы – глюканы, маннаны, липополисахариды (ЛПС). Данные соединения обладают пирогенными свойствами, т. е. способны индуцировать выработку цитокинов воспаления. В этом случае происходит стимулирование Th1-типа иммунного ответа и снижение активности Th2-типа иммунного ответа. Полагают, что такой механизм (снижение аллергической реактивности макроорганизма) включается при высоких концентрациях, например, ЛПС (100 мкг) [9]. Поэтому одним из объяснений резкого увеличения количества людей с гиперчувствительностью предполагают недостаточную микробную стимуляцию [13]. Низкие дозы ЛПС (0,1 мкг) индуцируют Th2-тип иммунного ответа при одновременном введении аллергена [13]. Грибы являются прямыми источниками аллергенов, но при разрушении клеток в окружающую среду выделяются β-глюканы и другие полисахариды. Данные соединения также неоднозначно воздействуют на иммунную систему человека. Протективный эффект против развития atopических заболеваний чаще отмечают у детей

[15]. Однако β-глюканы могут действовать и как адьювантные препараты при формировании аллергического ответа [11]. Следовательно, изучение количественных характеристик бактериальной и грибной обсемененности и содержания ПС в жилых и производственных помещениях весьма актуально. На наш взгляд, использование в качестве объекта исследования домашней пыли, наиболее информативно. Проведенные ранее испытания на примере бактериальной обсемененности помещений показали, что количество микробов в воздушной среде не меняется при смене времен года, а концентрация бактерий в пыли помещений зависит от времени года в московском регионе [1]. Последнее представляется очень интересным, т. к. концентрация других элементов пыли также зависит от сезона. Это относится, к примеру, к пыльце растений – переносчикам грибов.

Целью исследования было выявление корреляции между концентрацией соединений полисахаридной природы, способных подвергаться полимеризации в присутствии Ial-реагента, общей бактериальной обсемененностью и концентрацией грибов в пыли жилых помещений г. Москвы.

Материалы и методы

В 76 квартирах г. Москвы были собраны комплексные образцы пыли с постели и постельных принадлежностей, пола около кровати и мягкой мебели. Пыль собирали по методическим рекомендациям, утвержденной Госсанэпиднадзором Минздрава России [2]. Образцы пыли до про-

Частота выявления различного содержания ПС и предельные концентрации микромицетов (КОЕ/г пыли) и бактерий (НВЧК/г пыли) при различных значениях ПС в образцах домашней пыли

Содержание ПС (мкг/г пыли)	Общее число образцов пыли	Количество образцов пыли, %	Минимальное значение микромицетов, КОЕ/г пыли	Максимальное значение микромицетов, КОЕ/г пыли	Минимальное значение бактерий, НВЧК/г пыли	Максимальное значение бактерий, НВЧК/г пыли
0,3	16	21,06	5×10^3	$1,7 \times 10^5$	2×10^5	1×10^9
3,0	30	39,47	5×10^3	$3,7 \times 10^5$	2×10^5	1×10^9
6,0	9	11,84	5×10^3	$7,9 \times 10^4$	8×10^4	5×10^8
9,0	3	3,95	$3,4 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$	8×10^4	1×10^9
15,0	4	5,26	$1,7 \times 10^3$	$6,2 \times 10^4$	1×10^4	2×10^7
30,0	10	13,16	$3,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	1×10^5	2×10^7
96,0	4	5,26	$1,2 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4$	4×10^6	5×10^8

ведения анализа хранили 2-4 недели при -20°C . Количественное определение содержания бактерий в пыли проводили при помощи метода предельных разведений [5]. 10 мг пыли помещали в 1 мл стерильного физиологического раствора, перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре, затем готовили пятикратные разведения, 100 мкл каждого разведения вносили в пробирки с 10 мл тиогликолевой среды (НПО «Питательные среды», г. Махачкала). Посевы инкубировали 10 суток при 37°C . Визуальный контроль проводили ежедневно. Наиболее вероятное число микробных клеток (НВЧК/г пыли) вычисляли по таблице Мак-Креди [5]. Тинкториальные характеристики смешанных культур определяли путем окрашивания мазков по Граму. Для определения содержания КОЕ грибов 10 мг пыли помещали в 10 мл стерильной воды в присутствии 0,02% Tween 80. 200 мкл разведения помещали на стандартную среду Чапека и ксерофильную среду (среда – сусло-агар с 10%-ным хлористым натрием). Для подавления роста бактериальной флоры в среды добавляли 0,4% молочной кислоты. опыты ставили в 3-х повторностях. Чашки с посевами инкубировали в течение 10 дней при 25°C . Идентификацию грибов проводили на родовом уровне на основании морфологических признаков с помощью определителей [3, 4, 6, 8, 10, 14, 16]. Содержание ПС выявляли при помощи геля-тромб-теста по прилагаемой инструкции производителя «Lal-тест» (Associates of Cape Cod Inc.) и ОФС 42-0002-00. Чувствительность Lal-реактива составляла 0,03 ЕЭ/мл. Содержание ПС измеряли в пределах от 0,03 до 0,3 мкг/г пыли, от 0,3 до 3 мкг/г пыли, от 3 до 6 мкг/г пыли, от 6 до 9 мкг/г пыли, от 9 до 12 мкг/г пыли, от 9 до 15 мкг/г пыли, от 15 до 30 мкг/г пыли от 30 до 96 мкг/г пыли. Влажность в помещениях определяли

с помощью термогигрометра. Для статобработки данных использовали верхние предельные значения содержания ПС. Статистический анализ проводили при помощи программы Statistica 6 и Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждение

В результате исследования было установлено, что содержание ПС, водорастворимых и способных подвергаться полимеризации в присутствии Lal-реагента, колебалось в образцах пыли в пределах от 0,3 до 96 мкг/г пыли. Как следует из данных, приведенных в табл. 1, в домашней пыли содержание ПС в основном не превышало 3 мкг/г пыли. Несколько реже в образцах пыли определяли ПС, которое было не выше 0,3 мкг/г пыли. Частота встречаемости содержания ПС в пыли, равная 6 мкг/г пыли, близка к данному параметру для значения ПС, соответствующего 30 мкг/г пыли. Невысокая частота встречаемости содержания ПС (9 мкг/г пыли, как и 15 и 96 мкг/г пыли) в нашем случае, возможно, обусловлена небольшим числом образцов.

Метод предельных разведений достаточно удобен для одноэтапного определения количества столь разных по своим свойствам бактерий в одном образце. Конечный результат является расчетной величиной, поэтому не требуется дополнительная статистическая обработка результатов измерения числа бактерий в каждом образце. В нашем случае содержание микробов в образцах пыли находилось в пределах от 2×10^3 до 1×10^9 НВЧК/г пыли. При визуальном контроле над посевами в тиогликолевую среду было отмечено, что в образцах пыли присутствовали бактерии с различным характером роста (придонным, пристеночным или поверхностным), уровнем роста части бактерий, способности к образова-

Таблица 2

Частота выявления микромицетов (%) в образцах домашней пыли при указанных значениях ПС

Род гриба	Содержание ПС (мкг/г пыли)						
	0,3	3,0	6,0	9,0	15,0	30,0	96,0
Alternaria	43,8	50	27,3	66,7	0	50	25
Aspergillus	81,3	85,7	100	100	66,7	100	100
Aureobasidium	12,5	14,3	27,3	0	0	0	25
Botrytis	6,3	7,1	0	0	0	10	25
Cladosporium	50	60,7	54,5	33,3	33,3	40	75
Fusarium	0	0	9,1	0	0	0	0
Mucor	0	3,6	18,2	33,3	33,3	0	25
Paecilomyces	18,8	7,1	9,1	33,2	0	30	0
Penicillium	75	92,9	90,9	100	100	90	75
Phoma	12,5	3,6	9,1	0	0	0	0
Rhizopus	6,25	3,6	0	0	0	0	25
Scopulariopsis	0	3,6	0	0	0	0	0
Trichoderma	6,3	3,6	9,1	33,3	0	10	0
Ulocladium	0	21,4	27,3	0	0	30	50
Wallemia	0	10,7	0	33,3	66,7	10	0
Неидентифицированные	25	28,6	18,2	33,3	0	40	100
Количество образцов	16	28	12	3	3	10	4

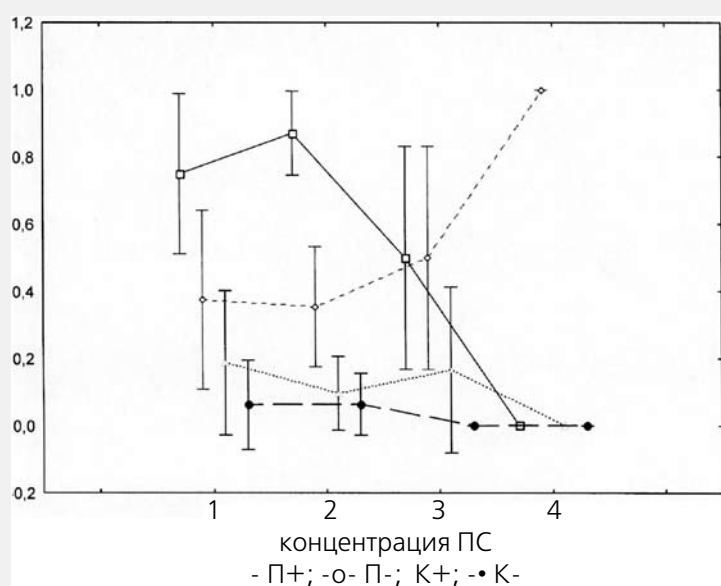


РИС. 1. Численность различных бактерий

(П+ – грамположительные палки; П- – грамотрицательные палки; К+ – грамположительные кокки; К- – грамотрицательные кокки) в зависимости от концентрации ПС в домашней пыли (1-0,3 мкг/г; 2-3 мкг/г; 3-6 мкг/г; 4-30 мкг/г пыли).

нию колоний в полужидкой среде и газообразованию. Анализ мазков посевов показал, что в большинстве случаев в одном образце домашней пыли присутствовали грамположительные и грамотрицательные бактерии одновременно. На рисунке 1 представлено распределение палочковидных и кокковидных грамположительных и грамотрицательных бактерий в образцах пыли, где содержание ПС не превышало указанные значения. Из приведенных данных видно, что увеличение количества ПС в домашней пыли связано с повышением встречаемости в образцах грамотрицательных палочковидных бактерий. Кокковидная флора, повидимому, в нашем случае не оказывала существенного влияния на количество ПС в пыли. Практически всем выделенным значениям ПС соответствовало несколько вариантов обсемененности пыли. Так, например, при наиболее высоком значении НВЧК определялось 0,3, 3 и 9 мкг ПС/г пыли, а при самом низком – 6 мкг ПС/г пыли. Возможно, это обусловлено выбранным методом определения содержания ПС. При сравнении данных хроматографического анализа образцов пыли с данными определения активности эндотоксина в этих же образцах, полученных при помощи Lal-теста, было показано, что длинноцепочечные жирные кислоты (C16-18)

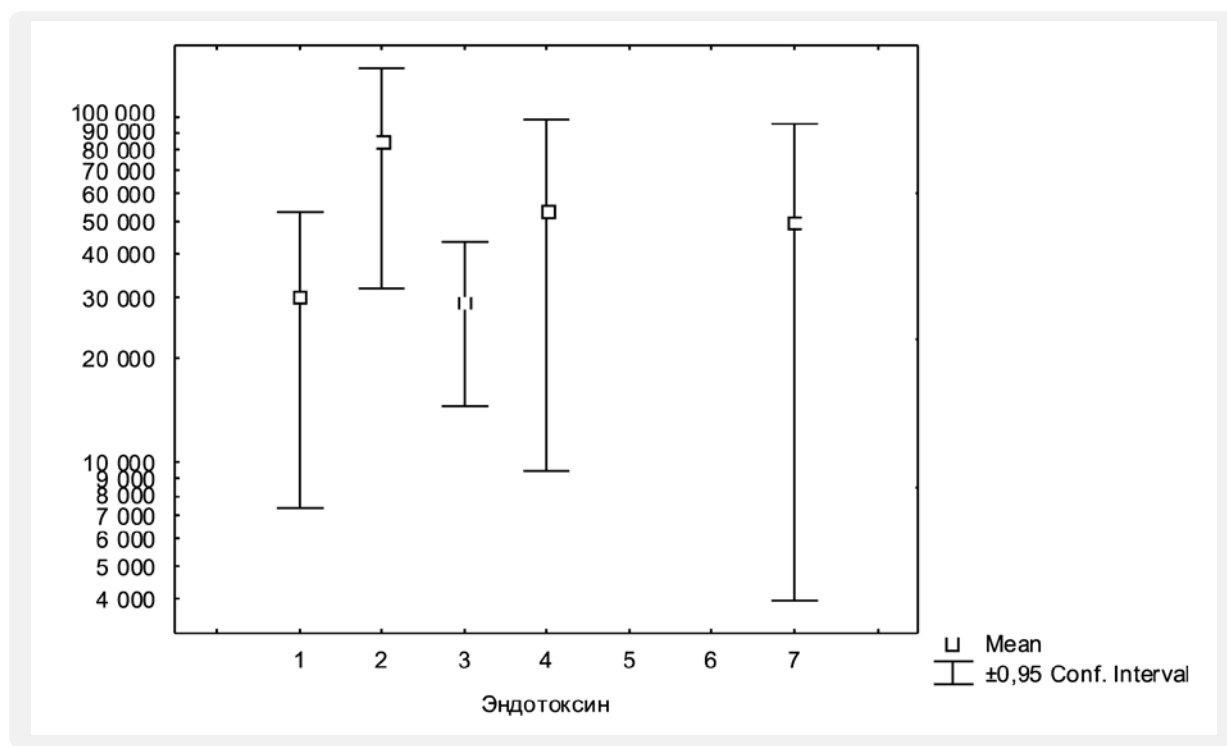


Рис. 2. Численность микромицетов (КОЕ/г пыли) при различной концентрации ПС: 1-0,3 мкг/г пыли; 2-3 мкг/г; 3-6 мкг/г; 4-9 мкг/г; 5-15 мкг/г; 6-30 мкг/г; 7-96,0 мкг/г.

преобладают в эндотоксине домашней пыли по сравнению с более короткими ЖК (С10-14), но активность ЭД положительно коррелировала с короткоцепочечными ЖК [12]. Соответственно, при использовании Lal-теста можно недооценить общую экспозицию ЛПС. Однако А. М. Andersson с сотрудниками показали, что с острой воспалительной реакцией связано присутствие в окружающей среде ЛПС, содержащих именно 3-ОНС14 ЖК [7]. Т. е. получение данных для оценки биореактивности помещений при помощи гел-тестом вполне допустимо.

В образцах домашней пыли были определены микромицеты родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Ulocladium*, *Wallemia*. В табл. 2 представлена частота выявления микромицетов в образцах домашней пыли при указанных значениях ПС. По суммарным данным абсолютно доминировали *Penicillium* и *Aspergillus*, встречаемость которых составляла 89% и 87% соответственно. Субдоминирующее положение занимали *Cladosporium* и *Alternaria*, их встречаемость – 55% и 44% соответственно. Встречаемость других родов микромицетов не превышала 24%. Влажность в московских квартирах в течение года варьирует, в основном, в пределах от 30 до

60%. Для активного роста грибов, попадающих в помещения с потоками воздуха, на одежде, шерсти животных или заносимых с землей для комнатных цветов, такие климатические условия не являются предпочтительными. Однако в неблагоприятных условиях грибы могут сохранять свою способность к росту значительное время. В нашем случае мы выявляли в пыли жилых помещений суммарно от $3,4 \times 10^3$ до $3,7 \times 10^5$ КОЕ/г пыли. В частности, указанным предельным значениям КОЕ соответствовало содержание ПС, не превышающее 3 мкг/г пыли. В табл. 1 показаны предельные концентрации КОЕ грибов в образцах пыли, в которых содержание ПС не превышало указанных значений. Как следует из приведенных данных, не было выявлено прямой зависимости между количеством ПС и концентрацией КОЕ грибов или таксономическим разнообразием в образцах пыли. Средняя численность грибов как при низком содержании ПС в пыли (0,3 мкг/г), так и при высоком (96 мкг/г) достоверно не отличалась (рис. 1а). Следует заметить, что гел-тест предназначен в основном для определения предельных количеств эндотоксина, а β -глюканы все-таки частично включаются в процесс полимеризации под действием Lal-реагента. Более того, β -глюканы целостных структур грибов труднодоступны и слабо растворимы в водных растворах.

Возможно поэтому мы не получили какой-либо корреляции между концентрацией мицелиальных грибов и содержанием ПС. В целом любой метод определения имеет свои преимущества и недостатки. Так, определение концентрации грибов и бактерий в различных сообществах проводят разными методами – микробиологическим, иммуноферментным, хроматографическим. Хроматографическим методом определяют элементы бактерий или грибов: жирные кислоты, эргостеролы. Определение концентрации микроорганизмов в таком случае происходит опосредованно. Иммуноферментным методом определяют, в основном, количество аллергенов. Микробиологическим методом можно определить только концентрацию способных к росту в определенных условиях единиц (КОЕ – колоний образующих единиц).

Таким образом, в результате проведенного исследования прямой корреляции между концентрацией КОЕ микромицетов, показателем общей бактериальной обсемененности и содержанием ПС, способных подвергаться полимеризации в присутствии Lal-реагента, в пыли помещений не было выявлено. Как в первом, так и во втором случаях высоким и низким предельным значениям ПС соответствовали диаметрально противоположные концентрации микроорганизмов. Ответная реакция макроорганизма на любое внешнее воздействие зависит от таких значимых параметров как генетически обусловленная реактивность организма, иммунная активность организма в момент контакта, количественная и качественная характеристики воздействующего агента. Жизнеспособные микроорганизмы и продукты их распада могут по-разному влиять на макроорганизм. Поэтому мы полагаем, что для получения более полной характеристики биологической реактивности жилых и других помещений необходимо определять как общую бактериальную обсемененность, концентрацию КОЕ грибов, так и содержание ПС.

Список использованной литературы

1. Ахупкина И. Г., Герасимова С. И., Плотникова Н. В. и др. Сравнительная характеристика микробной обсемененности воздуха и пыли городских жилых помещений. // Дез. Дело. – 2009. – №1. – С. 28-30.
2. Акарологическое и микологическое обследование помещений для профилактики аллергических заболеваний. Методические рекомендации. – Москва, 1999.
3. Кириленко Т. С. Атлас родов почвенных грибов. — Киев, Наукова думка, 1977. 128 с.
4. Кириленко Т. С. Определитель почвенных сумчатых грибов. – Киев, Наукова думка, 1978. – 264 с.
5. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М., Изд-во Моск. Ун-та. 1971. — 221 с.
6. Arx J. A. von. The genera of fungi sporulating in pure culture. — 1981. Vaduz, J. Cramer. 424 p.

7. Andersson A. M., Weiss N., Rainey F., Salkinoja-Salonen M.S. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. // J. Appl. Microbiol. – 1999. – №86. – P. 622-634.

8. De Hoog G. S., Guarro J., Gene J., Figueras M. J. Atlas of clinical fungi. 2000. CBS, Utrecht: «Universitat Rovira I Virgili Reus», Spain. – 1126 p.

9. Eisenbarth S. C., Piggott D. A., Huleatt J. W. et al. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. // J. Exper. Med. – 2002. – V. 196, №12. – P. 1645-1651.

10. Ellis M. B. Dematiaceae Hyphomycetes. – Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1971. – 608 p.

11. Instanes C., Ormstad H., Rydjord B. et al. Mould extracts increase the allergic response to ovalbumin in mice. // Clin. Exp. Allergy. – 2004. – V. 34, №10. – P. 1634-1641.

12. Park J. H., Szponar B., Larsson L. et al. Characterization of lipopolysaccharides present in settled house dust. // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70, №1. – P. 262-267.

13. Prioult G., Nagler-Anderson C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack microbial stimulation? // Immunol. Rev. – 2005. – V. 206, №1. – P. 204-218.

14. Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Filtenborg O. Introduction to food and airborne fungi. – Utrecht, CBS, 2000. – 389 p.

15. Schram-Bijkerk D., Doekes G., Boeve M. et al. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. — Clin. & Exp. Allergy. 2005. – V.35. – P. 1272-1278.

16. Sutton B. C. The Coelomycetes – Fungi imperfecti with picnidia, acervuli and stromata. – Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

Fungi, bacteria and polysaccharide compounds in a house dust

Akhupkina I. G., Antropova A. B., Zteltikova T. M. Establishment of Russian Academy of Medical Science, Institute of Vaccines and Sera named I.I. Mechnikov RAMS, Moscow.

A significant part of microorganisms to become an element of filling of house dust. Therefore dust is the most successful object for detection possible correlation between common bacterial contamination and concentration of the moulds and concentration of the polysaccharides capable induct ambiguous immune response of macroorganism. As a result of the carried research it was shown, that the contents of the polysaccharides in samples of dust changed in limits from 0,3 up to 96 mcg/g of a dust, thus the increase of quantity of the polysaccharides in a house dust is connected to increase of occurrence in samples Gramnegative rodshaped detection. However direct correlation between the contents of the polysaccharides and concentration of the moulds and common bacterial contamination of the dust was not detected. The quantity of the bacteria in house dust differed and was in limits from 2×10^3 up to 1×10^9 MPN/g (the most probable number of the microbial cells) of the dust. The quantity of the mould in house dust differed and was in limits from $1,7 \times 10^3$ to $3,7 \times 10^5$ CFU/g of the dust.

Key words: polysaccharides, bacteria, mould, environment, house dust, hypersensitivity.