

мед. наук. М., 2000. 38 с.

5. Либман Е.С., Шахова Е.В. Слепота и инвалидность по зрению в населении России // VIII съезд офтальмологов России: тезисы докладов. М., 2005. С.78–79.

6. Либман Е.С. Слепота и инвалидность вследствие патологии органа зрения в России // Офтальмология. Национальное руководство / под ред. С.Э.Аветисова [и др.]. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С.19–31.

7. Макаров П.Г. Глазные болезни и их профилактика. Красноярск: изд-во Красноярского ун-та, 1986. 200 с.

8. Розенблюм Ю.З., Онуфрийчук О.Н. Двухлетнее наблюдение за рефракцией, аккомодацией и длиной оси глаза у школьников в районе Крайнего Севера //

VIII съезд офтальмологов России: тезисы докладов. М., 2005. С.361–362.

9. Рубанова Г.В. Состояние остроты зрения, пространенность аномалий рефракции и заболеваний глаз у сельского населения Алтайского края: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Красноярск, 1972.

10. Тарутта Е.П., Кушнаревич Н.Ю., Иомдина Е.Н. Прогнозирование осложненного течения миопии у детей // Вестник офтальмол. 2004. №3. С.19–22.

11. Тарутта Е.П., Иомдина Е.Н., Ахмеджанова Е.В. Прогрессирующая миопия у детей: лечить или не лечить? // Вестник офтальмол. 2005. №2. С.5–8.

12. Шиловских О.В. Заболеваемость населения болезнями глаз и его придаточного аппарата в Свердловской области // Офтальмохирургия. 2010. №3. С.43–47.

Поступила 09.11.2011

Антон Сергеевич Выдров, ассистент кафедры глазных болезней,
675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95;
Anton S. Vydov,
95 Gorkogo Str., Blagoveshchensk, 675000;
E-mail: stilaris@gmail.com



УДК 615.451.16:615.322:616-08-031.81

В.М.Катола, Л.М.Павлова, Н.Ю.Леусова, Л.П.Носкова

ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭКСТРАКТОМ *VISCUM COLORATUM* (Kom.) Nakai

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН, Благовещенск

РЕЗЮМЕ

Установлено, что в воздухе закрытых помещений помимо культивируемых зачатков бактерий и микроскопических грибов циркулируют омертвевший мицелий грибов и различные варианты L-форм – множественные элементарные тельца, палочковидные и нитевидные бактериальные структуры. Предложено добавлять в простые питательные агаровые среды 10 мл экстракта *Viscum coloratum* в качестве дополнительной компоненты или полностью заменять им дистиллированную (водопроводную) воду. Эта модификация повышает диагностическую эффективность простых агаровых сред и выход «урожая»

колоний в процессе седиментации бактерий и грибов из воздуха закрытых помещений.

Ключевые слова: морфотипы бактерий и грибов в воздухе закрытых помещений, модификация агаровых сред, электронная микроскопия.

SUMMARY

V.M.Katola, L.M.Pavlova, N.Yu.Leusova,
L.P.Noskova

ABOUT EFFICACY OF NUTRIENT MEDIA MODIFIED BY THE EXTRACT OF *VISCUM COLORATUM* (Kom.) Nakai

It is established that in the air of closed premises besides cultivated rudiments of bacteria and microscopic

fungi, lifeless threads of fungi and various variants of L-forms (plural elementary bodies, cylindrical and threadlike bacterial structures) circulate. The extract of *Viscum coloratum* of 10 ml is offered to be added in simple nutrient agarinic media as an additional component or complete replace of distilled or waterpipe water. This updating raises the diagnostic efficacy of simple agarinic media and the output of colonies during the process of bacteria and fungi sedimentation from the air of closed premises.

Key words: morphotypes of bacteria and fungi, air of closed premises, updating of agarinic media, electronic microscopy.

По данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора [2] в местах с повышенным уровнем загрязнения атмосферы физическими, химическими и биологическими поллютантами проживает почти 50 млн россиян, что вызывает рост численности иммунокомпрометированных лиц, заболеваемости органов дыхания, зрения, кожи и пр. На этом фоне особое значение приобретает сохранение нормальной экологии воздуха жилых и производственных помещений, где человек проводит большую часть времени. В воздухе таких помещений в значительно больших концентрациях, чем во внешней среде, присутствуют пыль, оксиды углерода, азота, серы, радон, компоненты табачного дыма и другие вредные вещества. В нем стабильно циркулируют представители микробиоты, обитающей на слизистой оболочке верхних дыхательных путей и коже, и почти всегда содержатся патогенные виды. Но выделить их в чистую культуру и идентифицировать традиционными микробиологическими методами, что необходимо при диагностике инфекционных заболеваний или научных исследованиях, не всегда возможно. Во-первых, в неадекватных условиях бактерии часто изменяют форму, ультраструктурную организацию, метаболическую активность и другие биологические свойства; во-вторых, чтобы выжить они используют различные адаптивные механизмы, один из которых – L-трансформация [4, 8]. Наконец, в почве, воде, организме человека и животных, даже в продуктах питания патогенные и условно-патогенные бактерии, сохраняя жизнеспособность, могут переходить в некультивируемое состояние или некультивируемую форму [1, 5, 9]. Так поступает примерно 45 видов, в том числе санитарно-показательные *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella enteritidis*, *typhimurium*, *Shigella sonnei*, *flexneri u dysenteria*, *Vibrio* и др. [1, 7, 10]. Особенности образования, существования и распространения некультивируемых форм в природе и макроорганизме недостаточно изучены. В настоящее время для их обнаружения используются наиболее чувствительные и специфические молекулярно-генетические методы, в частности полимеразная цепная реакция и ее модификации. Тем не менее, микробиологическая диагностика по-прежнему остается доминирующей.

Учитывая ограниченность сведений о форме вегетативных и фенотипически измененных клеток микро-

организмов, циркулирующих в воздухе закрытых помещений, в данной работе представлены результаты прямого электронномикроскопического изучения морфологии бактерий и микроскопических грибов в воздухе служебных кабинетов Института геологии и природопользования ДВО РАН (ИГиП ДВО РАН). Кроме того, апробирована эффективность плотных питательных агаровых сред, эмпирически приготовленных с добавлением экстракта из растения-полупаразита омелы окрашенной – *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai и гуминовых веществ.

Материалы и методы исследования

Экстракт из *V. coloratum* (экстракт из омелы) получали, настаивая 15 г сухих стеблей в 100 мл горячей дистиллированной воды в течение 30 минут, гуминовые вещества экстрагировали из бурых углей Сергеевского месторождения (Амурская область). Питательные среды модифицировали, добавляя в 2% мясо-пептонный агар и 2% голодный агар в разных комбинациях 10 мл экстракта из омелы или 1-2 мл гуминовых веществ. Отдельно готовили 2% агар, заменяя дистиллированную (водопроводную) воду на экстракт из омелы. В течение 30 минут микроорганизмы седиментировали из воздуха на поверхность застывших питательных сред в открытых чашках Петри и липкую ленту, фиксированную к торцу объектного столика электронного микроскопа. После чего чашки закрывали крышками и помещали в термостат на 2, 4 и 8 суток при температуре 37°C. Объектный столик напыляли углеродом в вакуумной установке ВУП-4 и просматривали в сканирующих электронных микроскопах JEOL jsm 35 C (Япония) и LEO 1420 (Германия). Ориентировочную концентрацию микроорганизмов в 1 м³ воздуха определяли по формуле $x = 5a \times 102 \times 103 / 10 \times v \times t$, где x – количество бактерий и грибов в 1 м³, a – количество КОЕ (колони-образующие единицы), выросших на поверхности питательной среды, v – площадь чашки Петри в см², t – время экспозиции [3]. Такой методологический подход позволяет не только оценить диагностическую эффективность простых и модифицированных питательных сред, их чувствительность, накопление ими биомассы, определить культивируемые, трудно культивируемые или некультивируемые формы бактерий, но и визуализировать морфологию бактерий и грибов, циркулирующих в воздушной среде.

Результаты исследования и их обсуждение

Считается, что воздушная среда неблагоприятна для продолжительного пребывания микроорганизмов, за исключением спорообразующих бактерий и спор микроскопических грибов. Тем не менее, проведенные прямые электронномикроскопические исследования показали, что в воздухе служебных кабинетов ИГиП ДВО РАН находятся клубки мицелия микроскопических грибов (рис. а, б), элементарные тельца, нитевидные и палочковидные бактериальные структуры (рис. в, г).

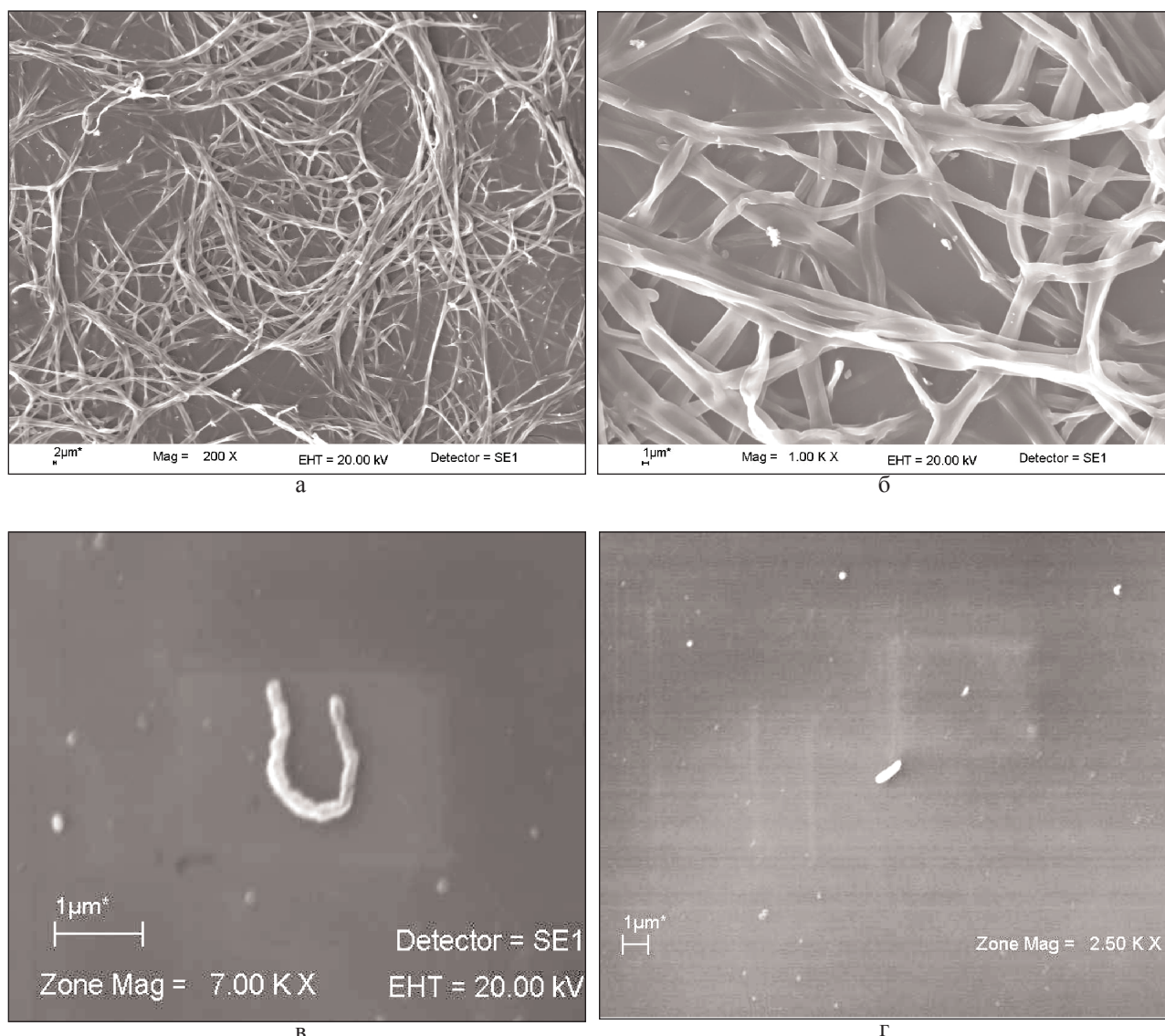


Рис. Сканирующая электронная микроскопия: а-б – мицелий грибов, седиментирующий из воздуха закрытого помещения ($\times 2000$ и 1000 , соответственно); в-г – бактериальные формы: фрагментированная нить, палочковидная клетка и элементарные тельца в воздухе закрытого помещения ($\times 7000$ и 2500 , соответственно).

Все морфотипы внешне отличаются от чистых культур, что, казалось бы, исключает их практическую значимость. На самом же деле они представляют собою глубоко трансформированные формы микроорганизмов, которые постоянно попадают в анатомические зоны человека при дыхании, приеме пищи, оседании на незащищенные участки кожи и пр. Более того, детали их морфологии являются своего рода индикаторами: а) способов адаптации и существования бактерий и микроскопических грибов в закрытом помещении; б) качества воздушной среды в каждом отдельном кабинете и микроклимата в целом (температуры, относительной влажности, инсоляции и т.д.). Именно в кабинетах как экосистемах формируются сообщества микроорганизмов, происходит их размножение, накопление и отмирание. Присутствие в воздухе переплетающихся дистрофических и лентовидно-деформированных гиф служит одним из признаков нежизнеспособности мицелия и в то же время сигнализирует о существовании колоний грибов во

влажных местах помещения (стены, пол, потолок, подвал и пр.). Чаще всего в воздух закрытых помещений грибные зачатки попадают с почвенной и производственной пылью или биоаэрозолями приземной атмосферы. По сравнению с бактериями их содержание гораздо меньше и возрастает лишь во время споруляции колоний, среди которых могут присутствовать потенциально опасные для здоровья *Aspergillus*, *Paecilomyces* и темноокрашенные плесени. В отличие от нежизнеспособного мицелия микроскопических грибов бактерии находятся в воздухе в виде элементарных телец, палочковидных клеток и фрагментированных нитей (рис. в, г). Данные литературы свидетельствуют о том, что все эти структуры полностью соответствуют сложному морфогенезу колоний L-форм бактерий [4, 8]. Поскольку элементарные тельца являются доминирующим элементом, отметим, что они ограничены трехслойной мембраной, способны увеличиваться в размерах, устойчивы к ультразвуку, антибиотикам и длительному высыханию. Но не

культивируются на рутинных питательных средах. Количество и состав морфотипов бактерий и грибов, визуализированных в кабинетах ИГиП ДВО РАН, зависит от площади помещения, численности и здо-

ровья сотрудников, их профессиональной деятельности, оборудования, движения воздуха в местах расположения чашек Петри, качества уборки помещения и пр.

Таблица 1

Количество жизнеспособных клеток микроорганизмов, выросших на модифицированных питательных средах при оседании из 1 м³ воздуха

Питательные среды	Количество КОЕ при инкубации		Количество КОЕ/м ³	Суммарно КОЕ/м ³
	48 часов	96 часов		
Голодный агар	-	0 / 2	0 / 42	42
Гуминовые вещества	-	-	-	-
Мясо-пептонный агар	9	9 / 3	190 / 63	253
Голодный агар и гуминовые вещества	-	-	-	-
Мясо-пептонный агар и гуминовые вещества	1	3 / 1	127 / 21	148
Голодный агар и экстракт из омелы	1	2 / 5	42 / 106	148
Голодный агар, гуминовые вещества и экстракт из омелы	-	0 / 4	0 / 85	85
Мясо-пептонный агар, гуминовые вещества и экстракт из омелы	3	9 / 3	190 / 63	253
Мясо-пептонный агар и экстракт из омелы	3	10 / 7	212 / 148	360

Примечание: (-) – отсутствие роста; КОЕ – колониеобразующие единицы; в числителе – КОЕ бактерий, в знаменателе – КОЕ грибов.

Для оценки загрязнения воздушной среды вегетативными клетками микроорганизмов используются простые агаровые среды. Но как видно из полученных результатов (табл. 1), их модификации экстрактом из омелы и гуминовыми веществами резко сказывается на диагностической ценности. Наибольшее количество КОЕ бактерий и микроскопических грибов, седиментировавших на чашки Петри из воздуха кабинетов, в течение четырех дней инкубации проросло на средах, содержащих экстракт *V. coloratum*. Несколько уступает им по чувствительности и «урожайности» мясо-пептонный агар, а на голодном агаре выросли одни лишь колонии грибов. На всех этих средах колонии сохраняют свои морфологические и культуральные свойства. Так, бактерии представлены различными кокковидными и палочковидными непигментированными и пигментированными видами, грибы – представителями рода *Penillium* и темноокрашенной плесенью. Что касается питательных сред, модифицированных гуминовыми веществами, то за весь период инкубации рост колоний бактерий или микроскопических грибов не наблюдался. Это означает, что гуминовые вещества в избранных дозах являются активными ингибиторами роста микроорганизмов.

Эффективность 2% плотной агаровой среды, при приготовлении которой дистиллированная (водопроводная) вода заменена на экстракт из омелы, отражена в таблице 2.

Таблица 2

Количество микробных клеток, выросших на 2% плотном агаре, приготовленном в экстракте *V. coloratum*

Место исследования	КОЕ	Количество КОЕ/м ³	Суммарно КОЕ/м ³
Кабинет №32	9 / 5	191 / 106	297
Кабинет №34	4 / 6	85 / 127	212
Комната №35	1 / 1	21 / 21	42
Кабинет №36	5 / 1	106 / 21	127
Кабинет №37	3 / 9	63 / 191	254
Кабинет №41	20 / 4	424 / 85	569
Бокс	4 / 6	85 / 127	212
Холл	20 / 3	424 / 63	699
Уличный воздух	39 / 20	827 / 424	1251

Примечание: в числителе – КОЕ бактерий, в знаменателе – КОЕ грибов.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что в воздухе закрытых помещений содержатся как культурабельные, так и не культивируемые формы бактерий и микроскопических грибов. Внесение экстракта *V. coloratum* в состав простых агаровых сред существенно улучшает их культуральные качества и выход КОЕ. Отмеченное свойство экстракта из омелы обусловлено, по-видимому, наличием в нем веществ, легко усвояемых микроорганизмами. До настоящего времени известно, что экстракт *V. coloratum* содержит 41 компонент, включая 11 флавоноидов, 2 гормона, 14 бензеноидов, 5 стероидов, инозитол и др. [6]. Следовательно, им можно заменять дистиллированную (водопроводную) воду при приготовлении питательных сред для прямого и накопительного выделения бактерий и микроскопических грибов. К тому же не исключено, что его химический состав стимулирует также и частичную реверсию L-трансформантов в исходные клетки. Однако вследствие неполной химической изученности рекомендовать экстракт *V. coloratum* для широкого использования преждевременно. Результаты экспериментов недостаточны, чтобы считать модифицированные питательные среды соответствующими минимальным критериям эффективности. Необходимо уточнить, какие ингредиенты экстракта из омелы являются стимуляторами роста бактерий и грибов, определить параметры их селекции, унифицированность и сохранность модифицированных сред, и, главное, воспроизводимость результатов. То есть, исследования нуждаются в дальнейшем продолжении.

В заключение добавим, что в план нашей работы не входили анализ и оценка санитарно-микробиологического состояния воздуха кабинетов ИГиП ДВО РАН. Тем не менее, необходимо принимать во внимание, что количество указанных в таблицах КОЕ занижено, поскольку седиментационным методом улавливается в три раза меньше жизнеспособных микробных клеток, чем при аспирационном способе. Именно высокое содержание в воздухе конидий микроскопических грибов, элементарных телец, нитевидных и палочковидных форм бактерий при определенных условиях у иммунокомпрометированных людей (с дефектами в иммунной системе) может индуцировать дискомфорт, синдром хронической утомляемости, аллергию и др.

Выводы

1. В воздухе закрытых помещений помимо культурабельных зачатков бактерий и микроскопических грибов циркулируют омертвевший мицелий и различные варианты L-форм – множественные элементарные

тельца, палочковидные и нитевидные бактериальные структуры.

2. Внесение 10 мл экстракта *V. coloratum* в качестве дополнительной компоненты простых агаровых сред или полная замена им дистиллированной (водопроводной) воды повышает диагностическую эффективность питательных сред и выход «урожая» колониеобразующих единиц бактерий и грибов в процессе их седиментации из воздуха закрытых помещений.

3. Гуминовые вещества, экстрагированные из бурых углей Сергеевского месторождения (Амурская область), ингибируют рост колониеобразующих единиц бактерий и грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Механизмы выживания бактерий / О.В.Бухарин [и др.] М.: Медицина, 2005. 363 с.
2. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2009 году». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 456с.
3. Егорова Л.Н., Климова Ю.А. Микробиота воздуха в помещениях различного назначения г. Владивостока // Микология и фитопатология. 2006. Т.40, вып.6. С. 487–493.
4. О роли латентных, трудно культивируемых и некультивируемых персистентных бактерий в патологии человека / И.В.Елисеева [и др.] // Анналы Мечниковского Института. 2006. №1. С.12–44.
5. Исаченко А.С. Изменение ультраструктуры бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и *Listeria monocytogenes* как результат адаптации к различным условиям существования: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2004. 198 с.
6. Леусова Н.Ю., Католла В.М., Крылов А.В. Фитохимия и лечебные свойства растений омелы (*VISCUM L.*) // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2008. Вып.28. С.69–73.
7. Мулюкин А.Л. Покоящиеся формы неспорообразующих бактерий: свойства, разнообразие, диагностика: автореф. дис. ...д-ра биол. наук. М., 2010. 48 с.
8. Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий (механизм образования, структура, роль в патологии). М.: Медицина, 1981. 236 с.
9. Соколенко А.В. Некультивируемые формы бактерий: распространение в природе, индукторы некультивируемого состояния и реверсии // Современные наукоемкие технологии. 2006. №2. С.11–15.
10. Юдин И.П. Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности // Annals of Mechnikov Institute. 2007. №3. Р.8–16.

Поступила 09.11.2011

Виктор Моисеевич Католла, ведущий научный сотрудник,
675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1;
Victor M. Katola,
1 Relochny Str., Blagoveshchensk, 675000;
E-mail: katola-amur@list.ru