

УДК 579.26:582.632.1(045)

Н. Николаєва асп.,
К. Гаркава, д-р біол. наук, зав. каф.
Національний авіаційний університет, Київ

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ЗАБРУДНЕННЯ ПИЛКУ *CORYLUS AVELLANA* L. З РІЗНИХ МІСЦЬ ЗРОСТАННЯ

Мета роботи – встановити типи мікроорганізмів, що спричиняють мікробіологічне забруднення пилку *Corylus avellana* L., котре призводить до полінозу. **Визначене загальне мікробне число для кожного зразка.** **Виявлені мезофільні аероби та анаероби, бактерії групи кишкової палички, дріжджі, гриби з родів: *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Paecylomyces*.**

Ключові слова: пилко, мікроорганізми, аероби, анаероби, дріжджі, гриби.

Пилко є рослинним продуктом, що містить вуглеводи, білки, ферменти, жирні кислоти, мінерали, вітаміни. Він піддається мікробіологічному забрудненню, спричинене умовами навколишнього середовища, оскільки в середині пиляка пилко – стерильний. Крім того, пилкові зерна містять протимікробні речовини (флавоноїди, фенольні кислоти) [4], а також мікробні спори, як інгібітори проростання [12]. Наявність мікроорганізмів на поверхні пилкових зерен підтверджує електронна мікроскопія [6]. На пилку присутня змішана мікрофлора, яка складається з грам-позитивних, грам-негативних мезофільних бактерій, термофільних актиноциетів, грибів [14].

Встановлено, що в пилку певного виду рослин виявлені мікроорганізми, які можна культивувати [5]. Також досліджували чи насправді пилкові зерна є забруднені ендотоксинами мікроорганізмів в достатніх кількостях, які можуть впливати на клінічний перебіг полінозу [4]. Зокрема, концентрація бактеріального ендотоксину для *Corylus avellana* L. становить 7,50 нг/мг, яка здатна діяти в якості ад'юванта до пилкового алергену і модулювати імунну відповідь.

Грам-негативні бактерії, що розвиваються на рослинних поверхнях або продуктах розкладання органічної речовини, виробляють ендотоксини, які є повітряними імунотоксикантами, здатними викликати запальні реакції в легенях людей і тварин [2; 7; 14]. Залежно від дози поглинаючого ендотоксину, виникає токсичний пневмоніт, хронічний бронхіт, подразнення слизової оболонки, або загострення несприятливих легеневи реакцій, що викликані екзогенними алергенами [10; 11].

Метою нашого дослідження був аналіз мікробіологічного забруднення пилку *C. avellana* зібраного з різних місць зростання.

Матеріали і методи. Для дослідження бактеріального забруднення пилку *C. avellana* відібрали 5 зразків в період цвітіння (кінець березня – початок квітня 2013 р.) з різних місць зростання: Ботанічний сад, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., (БСК-П); Ботанічний сад ім. О.В. Фоміна, м. Києва, (БСФ); Маріїнський парк, м. Києва (МП); околиці цементного заводу – м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., (ЦЗК-П); Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка, м. Києва, (НСБ).

Для приготування суспензій пилку використовували 1 г пилку *C. avellana* і 99 мл фізіологічного розчину (0,85% NaCl). Розчин 100 мл використовували для зразків № 1, 5, 6, а для зразків № 2, 3, 4 використовували 0,1 г пилку і 9,9 мл фізіологічного розчину (0,85% NaCl), отримуючи суспензію об'ємом 10 мл. Розчини гомогенізували 20 хв. на шейкері.

Наступні розведення концентрацій готували відповідно до десятикової системи розведення. Для дослідження мікробіологічних груп використовували розведення 10^{-2} і 10^{-3} , тобто, по 0,1 і 1 мл у дворазовій повторюваності. Культивування мікроорганізмів відбувалось у відповідних специфічних умовах (табл. 1). Мікробіологічні дослідження здійснювали відповідно до стандартів STN EN ISO 4833 (1997) – загальна кість мікроорганізмів, STN ISO 4832 (1997) – коліформні бактерії, STN ISO 7954 (1997) – мікроскопічні гриби. Утворені колонії на пластинах поживних середовищ у чашках Петрі були підраховані і виражені у вигляді колонієутворюючих одиниць (КУО).

Таблиця 1

Умови культивування мікроорганізмів

Група мікроорганізмів	Розведення	Поживне середовище	Спосіб розміщення	O ₂	Температура	Час
Загальний підрахунок мікроорганізмів	10 ⁻² – 10 ⁻³	ГТД	вбудовування	аероби	30°C	48-72 год
Коліформні бактерії		ФЧЖЛ	на поверхні	аероби	37°C	24 год
Мезофіли		ГТД	вбудовування	аероби	30°C	48 год
Мезофіли		ГТД	вбудовування	анаероби	25°C	38 год
Мікроскопічні гриби		СА	вбудовування	аероби	25°C	5-7 днів

Умовні позначення: ГТД – агар з глюкозою, триптоном і дріжджовим екстрактом; ФЧЖЛ – агар з фіолетовими кристалами, червоним нейтральним, солями жовчних кислот і лактозою; СА – солодовий агар.

Середовища для анаеробів поміщали в анаерокультивар (Merck, Дартмштат). Умови культивування були скориговані відповідно до досліджуваної групи мікроорганізмів. Після культивування ми підраховували колонії на чашках Петрі. Для розрахунку КУО (колонієутворюючих одиниць) була використана наступна формула, що враховує кількість чашок для послідовних розведень:

$$N = \sum C / [(n_1 + 0,1 n_2) D],$$

де $\sum C$ – сума характерних колоній на вибраних чашках Петрі; n_1 – кількість чашок Петрі, підрахованих для меншого розведення; n_2 – кількість чашок Петрі, підрахованих для більшого розведення; D – ступінь розведення пилку (ідентичний меншому розведенню).

Якщо колонії мікроорганізмів були представлені лише в чашках Петрі другого розведення (10^{-2}), значення КУО·г⁻¹ визначали співвідношенням між загальною кількістю пластин поживного середовища і колоній, в якому вони культивувались, помноженому на зворотне розведення (тобто 10). Значення були злогарифмовані, а результати представлені, як log КУО·г⁻¹.

Для дослідження мікроскопічних грибів як поживне середовище використовували солодовий агар. Таким чином, нами були ідентифіковані гриби родів – *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Paecylomyces*.

Результати та їх обговорення. Кількість мезофільних грам-негативних бактерій для пилку *S. avellana* становить 2000 КУО/г пилку [14], а також відмічено 4 фази мікробного розвитку [3].

Досліджуючи дані зразки, було становлено, що для розведення пилку 10^{-2} загальне мікробне число становить $3,54 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ ($\pm 0,31$), мезофільні аероби – $4,17 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$, мезофільні анаероби – $3,5 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$, дріжджі – $2,56 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ у пилку з Ботанічного саду

м. Кам'янець-Подільський. Виявлені гриби з родів: *Cladosporium* – $4,00 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ (Ботанічний сад м. Кам'янець-Подільський), *Penicillium* – $3,70 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ (Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка), *Alternaria* – $3,3 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ (Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка), *Paecylomyces* і *Aspergillus* – $3,00 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ (Маріїнський парк м. Києва), *Rhizopus* – не виявлено. (табл. 2).

Таблиця 2

Сукупність мікроорганізмів в $\log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$

№	Зразок	КФБ	ЗМЧ	МзАр	МзАнр	Држ	Гриби						
							Clad	PNC	Alt	Rhiz	Paec	Asp	
Розведення пилкової суспензії 10^{-2}													
1	БСК-П	0,00	3,34	4,56	4,41	4,08	4,00	3,48	0,00	0,00	0,00	0,00	
2	БСФ	0,00	3,70	4,34	3,00	3,48	3,85	3,60	0,00	0,00	0,00	0,00	
3	МП	0,00	3,70	3,67	3,00	3,60	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	3,00	
4	ЦЗК-П	0,00	3,70	3,78	3,30	0,00	3,90	3,00	3,00	0,00	0,00	0,00	
5	НБС	0,00	3,00	4,00	3,48	0,00	3,95	3,70	3,3	0,00	0,00	0,00	
Розведення пилкової суспензії 10^{-3}													
1	БСК-П	0,00	3,28	4,61	4,49	4,15	4,11	3,78	0,00	0,00	0,00	0,00	
2	БСФ	3,00	3,60	4,11	3,00	3,30	3,7	3,49	0,00	0,00	0,00	0,00	
3	МП	3,00	3,48	3,78	3,60	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	
4	ЦЗК-П	0,00	3,30	3,60	3,60	0,00	3,78	3,3	3,00	0,00	0,00	0,00	
5	НБС	0,00	3,00	4,11	3,70	0,00	3,95	3,48	3,3	0,00	0,00	0,00	

Умовні позначення: БСК-П – Ботанічний сад, м. Кам'янець-Подільський; БСФ – Ботанічний сад ім. О.В. Фоміна; МП – Маріїнський парк; ЦЗК-П – околиці цементного заводу м. Кам'янець-Подільського; НБС – Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка; КФБ – колиформні бактерії; ЗМЧ – загальне мікробне число; МзАр – мезофільні аероби; МзАнр – мезофільні анаероби; Држ – дріжджі; Clad – *Cladosporium*; PNC – *Penicillium*; Alt – *Alternaria*; Rhiz – *Rhizopus*; Paec – *Paecylomyces*; Asp – *Aspergillus*.

Під час вивчення мікробіоти пилку у розведенні 10^{-3} встановлено: колиформні бактерії – $1 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$, загальне мікробне число – $3,42 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$, мезофільні аероби – $4,15 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$, мезофільні анаероби – $3,69 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$, дріжджі – $1,79 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$. Знайдені гриби з родів: *Cladosporium* – $4,11 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ (Ботанічний сад м. Кам'янець-Подільський) і $3,95 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ (Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришко), *Penicillium* – $3,78 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$ (Ботанічний сад м. Кам'янець-Подільський), *Alternaria* (Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка) та *Rhizopus* – $3,00 \log \text{КУО} \cdot \text{г}^{-1}$, *Paecylomyces* і *Aspergillus* – не виявлено. (табл. 2).

Дослідження факторів мікробіологічного забруднення пилкових зерен [9] дозволили встановити відсоток грибів у загальному мікробному числі, що коливається в межах 2,5-76,9% (*Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Alternaria* spp., *Bacillus* spp.). Гриби, що належать до родів *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* володіють сильними алергенними властивостями [10; 13]. Серед грибів, представники родів *Aspergillus* і *Penicillium* можуть представляти небезпеку, як потенційне джерело алергенів і мікотоксинів (охратоксин, зералерон, фумонізони, ніваленон та ін.) [8]. Відомо, що мікроскопічні гриби *Rhizopus stolonifer* ((Ehrenb.) Vuill) та представники родів *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., можуть викликати у людини алергічний стан.

На сьогодні відомо, що мікоалергози – це захворювання, які пов'язані із сенсibiliзацією організму, спричинені грибами родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*. Зараження відбувається через вдихання спор. [1] Виявленні наступні роди грибів в пилку *S. avellana*, які можуть викликати сенсibiliзацію у людей схильних до полінозу: *Alternaria* – головний рослинний патоген, який є алергеном і може викликати сінну лихоманку, реакції гіперчутливості, опортуністичні інфекції в людей з ослабленим імунітетом; *Penicillium* – продукує пеніцилін, молекули якого застосовуються як антибіотики; *Cladosporium* – найпоширеніші повітряно-крапельні гриби, які є патогенними для людини і можуть викликати синузити і легеневі інфекції, а також виробляють міко-

токсини і летючі органічні сполуки; *Aspergillus* – деякі види цього є патогенними, можуть спричинювати алергічні захворювання, виробляють афлатоксини, які в поєднанні з іншими мікотоксинами розвивають канцерогенні властивості, крім того спричинюють хворобу – аспергильоз, найпоширеніше інфекційне ураження навколо носових пазух (*A. fumigatus*); *Rhizopus* – сапробіотичні гриби, можуть виступати як опортуністичний агент людини; *Paecylomyces* – можуть викликати синузити, опортуністичні мікози.

Серед грибів роду *Aspergillus* було ідентифіковано гриби групи *A. niger* Tieg (у зразку з Маріїнського парку м. Києва), які на фоні ослабленої імунної системи людини можуть викликати ряд захворювань центральної нервової системи, хвороби шлунковокишкового тракту, шкіри та інших органів [12, 13]. *A. niger* є потенційним токсиноутворювачем, може синтезувати афлатоксини, охратоксин А та нітрогініл.

Висновки. Виявлено асоціації мікроорганізмів із пилком *Corylus avellana* L., а саме: колиформні бактерії, мезофільні аероби, мезофільні анаероби, дріжджі, гриби (види з родів *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Paecylomyces*). На поверхні пилкових зерен знаходяться різні види мікроорганізмів. Їх видова приналежність залежить від території збору зразків пилку. Зокрема, кількість мезофільних аеробів, грибів з родів *Penicillium*, *Alternaria* відносно однакова, як у Хмельницькій, так і у Київській областях, а от мезофільні анаероби, гриби з роду *Cladosporium* присутні в обох областях, але в Хмельницькій – кількісно їх більше. Гриби з родів *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Paecylomyces* присутні лише в Київській області.

Список використаних джерел

1. Люта В. А. Мікробіологія: підручник / В.А. Люта, О.В. Кононов. – К.: Медицина, 2008. – С. 411.
2. Burrell R. Immunotoxic reactions in the agricultural environment / R. Burrell // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 1995. – № 2. – P. 11-20.
3. Cevtchik V. Mikrobiologie pylového kvasení / V. Cevtchik – Publ. Fac. Sci. Univ. Masaryk, 1950. – P. 103-130.

4. *Carpes S.T.* Biological activity of honeybee-collected pollen in Brazil / S.T. Carpes, R. Begnini, S.M. Alencar, M.L. Masson / IntradFood-EFFoST Conference. – 2005. – P. 371-374.

5. *Colldahl H.* Allergens in pollen / H. Colldahl, G. Carlsson // *Acta allergologica*. – 1968. – № 23. – P. 387-395.

6. *Colldahl H.* Possible relationship between some allergens (pollens, mites) and certain microorganisms (bacteria and fungi) / H. Colldahl, L. Nilsson // *Acta allergologica*. – 1973. – № 28. – P. 283-295.

7. *Donham K.J.* Characterization of dusts collected from swine confinement buildings / K.J. Donham, W. Pendorf, U. Palmgren, L. Larsson // *American Journal of Indian medicine*. – 1986. – № 10. – P. 294-297.

8. *Dutkiewicz J.* Levels of bacteria, fungi, and endotoxin in bulk and aerosolized corn silage / J. Dutkiewicz, S. A. Olenchock, W. G. Sorenson, V. F. Gerencser, J. J. May, D. S. Pratt, V. A. Robinson // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1989. – № 55(5). – P. 1093-1099.

9. *Gora A.* Occupational exposure to organic dust, microorganisms, endotoxin and peptidoglycan among plants processing workers in Poland / A. Gora, B. Mackiewicz, P. Krawczyk, M. Golec, C. Skorska, J. Sitkowska, G. Cholewa, L. Larsson, M. Jarosz, A. Wojcik-Fatla, J. Dutkiewicz // *American Journal of Indian medicine*. – 2009. – № 16. – P. 143-150.

10. *Lacey J.* Bioaerosols and occupational lung disease / J. Lacey, J. Dutkiewicz // *Journal of Aerosol Science*. – 1994. – № 25. – P. 1371-1404.

11. *Michel O.* Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects / O. Michel, J. Duchateau, R. Sergysels // *Journal of Applied Physiology*. – 1989. – № 66. – P. 1059-1064.

12. *Pandy D.K.* Fungitoxicity in pollen grains / D.K. Pandey, P.M. Tripathy, R.D. Tripathy, S.N. Dixit // *Grana*. – 1983. – № 22. – P. 31-32.

13. *Samsøe-Jensen T.* Sensitization by special exposure illustrated by two cases of allergy to *Cladosporium fulvum*. / T. Samsøe-Jensen // *Acta allergologica*. – 1955. – № 9. – P. 38-44.

14. *Spiewak R.* Bacterial endotoxin associated with pollen as a potential factor aggravating pollinosis / R. Spiewak, S. Czeslawa, Z. Prazmo, J. Dutkiewicz // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. – 1996. – № 3. – P. 57-59.

15. STN ISO 4832: Mikrobiology – M4. Загальні рекомендації з визначення коліформних бактерій методом підрахунку колоній в продуктах харчування і кормах, 1997.

16. STN EN ISO 4833: Mikrobiology – M1. Загальні рекомендації на встановлення загальної кількості мікроорганізмів методом підрахунку колоній в продуктах харчування і кормах, 1997. 18. STN ISO 7954: Mikrobiology – M10. Загальні рекомендації для визначення дріжджів і грибів в продуктах харчування і кормах, 1997.

Надійшла до редколегії 30.06.14

Н. Николаева, асп.,
К. Гаркава, д-р биол. наук
Национальный авиационный университет, Киев, Украина

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПЫЛЬЦЫ *CORYLUS AVELLANA* L. С РАЗНЫХ МЕСТ ПРОИЗРАСТАНИЯ

Цель работы – установить типы микроорганизмов, которые вызывают микробиологическое загрязнение пыльцы Corylus avellana L., что приводит к поллинозу. Определенное общее микробное число для каждого образца. Обнаружены мезофильные аэробы и анаэробы, бактерии группы кишечной палочки, дрожжи, грибы из родов: Alternaria, Penicillium, Cladosporium, Aspergillus, Rhizopus, Paecylomyces.

Ключевые слова: пыльца, микроорганизмы, аэробы, анаэробы, дрожжи, грибы.

N. Nikolaieva, postgraduate student
K. Garkava, Dr. Sci. (Biol.)
National Aviation University, Kyiv, Ukraine

MICROBIOLOGICAL POLLUTION POLLEN *CORYLUS AVELLANA* L. FROM DIFFERENT HABITATS

The aim is establish the types of microorganisms, which caused microbiological contamination the pollen Corylus avellana L. and that caused the pollinosis. There was identification the total microbial count for every of samples, mesophilic aerobes and anaerobes, coliform bacteria, yeasts, fungi of genuses: Alternaria, Penicillium, Cladosporium, Aspergillus, Rhizopus, Paecylomyces.

Key words: pollen, microorganisms, aerobes, anaerobes, yeasts, fungi.

УДК 581.4: 581.522.5:581.45+582.671.16 :580.006(477.20)

Н. Нужи́на, канд. біол. наук, наук. співроб.
Т. Мазур, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.
А. Дідух, канд. біол. наук, мол. наук. співроб.
М. Дідух, канд. біол. наук, наук. співроб.

Ботанічний сад ім. акад. О.В. Фоміна, ННЦ "Інститут біології"
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

АНАТОМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ГЕТЕРОФІЛІЇ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *NYMPHAEA* L.

На анатомічному рівні виявлено відмінні механізми пристосування до умов навколишнього середовища 10 видів роду Nymphaea L. Проведено порівняльне дослідження анатомічної будови плаваючих та надводних листків. Виявлені зміни в будові листків в літній та зимовий періоди.

Ключові слова: Nymphaea L., анатомія листка, гетерофілія.

Представники родини *Nymphaeaceae* Salisb. та систематично близькі до неї родини (*Cabombaceae* A. Richard, *Ceratophyllaceae* S. F. Grey) – найвизначніші в структурі світової гідрофітобіоти. Особливої уваги заслуговує питання походження гідрофілії і гетерофілії у цих покритонасінних рослин, яке обговорюється ботаніками впродовж сторіччя [2; 7]. Рід *Nymphaea* L., що сформувався у міоцені, відноситься до стародавніших покритонасінних рослин, які є ремігрантними видами [2; 4]. Це посилює інтерес до вивчення гетерофілії даного роду.

Вивчення анатомічного критерію роду дозволить встановити функціональні особливості листків різних типів, що зможе пояснити наявність особливої пластичності даних рослин до змін умов середовища. Такі дані допоможуть в збереженні і відтворенні генофонду рідкісних та красиво квітучих видів водних рослин в умовах культури.

Матеріали та методи. Об'єктами наших досліджень були такі види роду *Nymphaea* з колекції Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна: *N. alba* L., *N. caerulea* Saving., *N. capensis* Thunb., *N. lotus* L., *N. Mexicana*

Zucc., *N. micrantha* Guill. et Perr., *N. rubra* Roxb. ex Salisb., *N. stellata* Willd., *N. zenkeri* Gilg.

Для анатомічних досліджень надводні (такі, що не торкаються нижньою поверхнею води) та плаваючі на водній поверхні листки збирали влітку, у фазі 2-3 днів після розкриття та додатково взимку (рис. 1). Зразки фіксували за Чемберленом [5]. Заливали в желатин за стандартною методикою [6] та за допомогою заморожувача мікротома виготовляли поперечні зрізи товщиною 15-20 мкм. Зрізи забарвлювали сафраніном. Додатково мацерували листки з метою вивчення епідермісу з адаксіальної та абаксіальної поверхні листка. При описуванні епідермісу листової пластинки використовували методики С. Захаревича і М. Баранової [3; 1]. Мікроскопічні виміри проводили за допомогою окуляр-мікромметра на мікроскопі XSP-146TR. Статистична обробка даних проводилась за допомогою програми Statistica 6, достовірність результатів визначали за t-критерієм Стьюдента. Фотографії зроблені за допомогою цифрової камери Canon Power Shot A630.