

Rozdział VI

PRZYDATNOŚĆ RÓŻNYCH PODŁOŻY DO HODOWLI GRZYBÓW IZOLOWANYCH Z POWIETRZA POMIESZCZEŃ

Elżbieta EJDYS*

Maria DYNOWSKA

Ewa SUCHARZEWSKA

Anna BIEDUNKIEWICZ

Dariusz KUBIAK

Poznanie możliwie pełnego spektrum taksonomicznego mykobioty pomieszczeń jest ważne ze względów poznawczych, epidemiologicznych i profilaktycznych. Dlatego celem badań było określenie przydatności wybranych podłoży do hodowli grzybów pochodzących z bioaerozolu wewnętrznego pomieszczeń edukacyjnych. Próby z 52 stanowisk, pobrane standardowo, na podłoża z różem bengalskim, Sabourauda i Czapek-Doxa inkubowano w temperaturach: 22 i 37°C. Największą różnorodność gatunkową stwierdzono na podłożu Sabourauda – 86 gatunków, najmniejszą na podłożu Czapek-Doxa – 37. Aż 14 gatunków wspólnych odnotowano na podłożach Sabourauda i z różem bengalskim, podczas gdy na podłożach Czapek-Doxa i z różem bengalskim tylko 4. Dla wszystkich testowanych podłoży również tylko 4 gatunki były wspólne. Wyniki sugerują potrzebę stosowania w badaniach monitoringowych bioaerozolu wewnętrznego różnych substratów hodowlanych i różnych warunków inkubacji.

1. WSTĘP

Okresowa i cyklicznie prowadzona ocena mykologiczna powietrza wewnętrznego w budynkach różnego typu jest ważna z wielu powodów. Można ją traktować jako jeden z elementów biomonitoringu. Znajac skład mykobioty budynku możemy określić jego wiek, stan sanitarny i techniczny oraz potrzebę ewentualnego remontu. Zróżnicowane gatunkowe grzybów świadczy także o sposobie użytkowania pomieszczeń i zdrowiu użytkowników, ponieważ około 1/3 grzybów notowanych w budynkach jest z reguły związana z organizmem ludzkim i wymaga do rozwoju lub toleruje temperaturę 37 °C [8]. W klimacie umiarkowanym obecność grzybów w powietrzu atmosferycznym jest determinowana przez czynniki biotyczne, abiotyczne i zmiany fenologiczne [11], natomiast bioaerozol wewnętrzny podlega fluktuacjom związanym w znacznej mierze, z ogrzewaniem pomieszczeń lub brakiem ogrzewania [6]. Okres grzewczy w niektórych rejonach Wschodniej Europy może trwać 7 miesięcy. Jesienią i zimą mieszkańcy polskich miast większość czasu spędzają w pomieszczeniach zamkniętych, dzieci i młodzież przebywają na terenie szkół do 8 godzin dziennie [3]. Kompleksy szkolne należą do budynków użyteczności

publicznej, spełniającym różne funkcje: nauka, zabawa, spożywanie posiłków i uprawianie sportu.

Wyniki badań własnych [4] dotyczące obecności grzybów w bioaerozolu wewnętrznym wykazały, że pomieszczenia szkolne intensywnie użytkowane, takie jak: korytarze czy szatnie, są wyjątkowo bogate w gatunki, które stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia dzieci i pracowników szkoły. Diaspory grzybów wdychane z powietrzem, coraz częściej wymieniane są nie tylko jako przyczyna grzybic, ale także odczynów alergicznych lub/i mykotoksykoz wywołanych metabolitami wtórnymi grzybów. Te ostatnie mają tendencję do kumulacji w różnych częściach ontosfery, szczególnie w narządach mięszsowych [14]. Według Kurnatowskiej [13] przez ontosferę należy rozumieć ustrój człowieka wraz ze wszystkimi mikroorganizmami zasiedlającymi go. W badaniach wstępnych/wycinkowych [9] stwierdzono, że pomieszczenia szkolne stwarzają większe zagrożenie zakażeń grzybami niż powietrze na zewnątrz budynków. Wniosek taki wysunięto na podstawie porównania liczebności grzybów drożdżopodobnych uzyskanych z bioaerozolu budynku szkolnego o prawidłowych parametrach wilgotności i temperatury oraz z powietrza atmosferycznego. W pierwszym przypadku odnotowano aż 28 gatunków z 15 rodzajów (wszystkie notowane w materiałach klinicznych pochodzących od człowieka), a w drugim 24 gatunki z 14 rodzajów [9].

Poznanie możliwie pełnego spektrum taksonomicznego grzybów pomieszczeń szkolnych jest ważne ze względów poznawczych, epidemiologicznych i profilaktycznych. Dlatego celem badań było sprawdzenie przydatności różnych podłoży do wzrostu grzybów wyizolowanych z bioaerozolu wewnętrznego pomieszczeń edukacyjnych i wskazanie optymalnych warunków hodowli.

2. MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były grzyby uzyskane z wybranych pomieszczeń dwóch szkół. Obydwa budynki zostały zbudowane w latach 70-tych XX wieku, w technologii wielkiej płyty. Aktualnie są użytkowane przez podobną liczbę osób. Budynek I usytuowany jest w dzielnicy mieszkaniowej wielorodzinnej, blisko centrum miasta. Od strony południowej graniczy z parkiem (przewaga drzew liściastych, fontanna, staw z ptactwem wodnym). Budynek II znajduje się w dzielnicy domków jednorodzinnych. W odległości 50 m od szkoły rozpościerają się łąki i pola uprawne. Okres grzewczy trwa od października do kwietnia. We wrześniu, maju i czerwcu użytkownicy budynków szkolnych korzystają z pomieszczeń nie ogrzewanych.

Tabela 1. Skład podłoży zastosowanych w badaniach

Table 1. The composition of media used in the study

Nazwa podłoża	stałe Sabourauda	z różem bengalskim	Czapek-Doxa
Źródło węgla	40,0 g glukozy	10,0 g glukozy	30,0 g sacharozy
Źródło azotu	10,0 g peptonu	5,0 g peptonu	3,0 g azotanu sodowego
Źródło mikroskładników	10,0 g peptonu	5,0 g peptonu 1,0 g fosforanu potasu 0,5 g siarczanu magnezu	1,0 g wodorofosforanu potasowego 0,5 g chlorku potasowego 0,05 g siarczanu magnezowego 0,01 g siarczanu żelazawego
Inhibitory	-	0,1 g chloramfenikolu 0,025 g rózu bengalskiego	-
Substancja zestalająca	20,0 g agaru	15,0 g agaru	20,0 g agaru
pH	5,6-5,8	7,2	6,8
H ₂ O	940	967,4	945,4

Tabela 2. Różnice w liczbie kolonii i gatunków uzyskanych na analizowanych podłożach mikrobiologicznych

Table 2. Differences in the number of colonies and species obtained in the analyzed microbiological media

Rodzaj podłoża	Podłoże Sabourauda	Podłoże Czapek-Doxa	Podłoże z różem bengalskim	Razem
Liczba kolonii	942	1221	694	2857
Liczba kolonii drożdżaków	69	377	103	549
Liczba kolonii grzybów pleśniowych	873	844	591	1826
Liczba gatunków	86	37	51	174
Liczba gatunków wyizolowanych tylko z tego podłoża	54	29	27	110
Liczba izolatów niezidentyfikowanych:	68	48	19	135
w 22°C	61	16	14	91
w 37°	7	32	5	44

Do badań mykologicznych wytypowano pomieszczenia o różnym sposobie użytkowania na wszystkich kondygnacjach, po 13 w każdym budynku. Na ścianach nie zauważono makroskopowych zmian świadczących o rozwoju grzybni. Próby z powietrza pobrano metodą sedymentacji. Stanowiska badawcze wyznaczono w dwóch narożach każdego pomieszczenia, po przekątnej. Łącznie wyznaczono 52 stanowiska badawcze. Próby inkubowano równolegle w temperaturach: 22 i 37°C, na podłożach: Sabourauda, Czapek-Doxa i z różem bengalskim [5,7] przyjmując standardowy tok diagnostyczny zalecany w laboratoriach mykologicznych [2].

DYSKUSJA WYNIKÓW

Osmotroficzny sposób odżywiania grzybów, polega na wydzielaniu do podłoża egzoenzymów, zewnątrzkomórkowym rozkładzie substratów i wchłanianiu produktów rozkładu na drodze osmozy. Sygnałem do wytwarzania egzoenzymów, najczęściej o charakterze adaptatywnym, jest obecność pokarmu w otoczeniu. Bogactwo związków organicznych i nieorganicznych w pomieszczeniach stanowi źródło pożywienia dla licznych grzybów saprotroficznych, głównie micromycetes: drożdży i grzybów drożdżopodobnych oraz grzybów pleśniowych [10,15]. Większość z nich należy do potencjalnych antropopatógenów. W badaniach uzyskano 549 kolonii drożdżaków i 1826 kolonii grzybów pleśniowych (tab.3). należących do 174 gatunków (tab.2.). Aż 110 gatunków wyizolowano tylko na jednej z zastosowanych pożywek. Świadczy to o pewnej specyfice potrzeb metabolicznych grzybów. Wydaje się, że najważniejszym czynnikiem różnicującym liczebność gatunków na poszczególnych podłożach jest źródło azotu (tab.1.). Nieorganiczne źródło azotu jest dostępne dla mniejszej grupy gatunków niż źródło organiczne – pepton. Dlatego największą różnorodność gatunkową zaobserwowano na podłożu Sabourauda – 86 gatunków, a najmniejszą na podłożu Czapek-Doxa – 37 gatunków. Tylko 4 gatunki grzybów rosły na wszystkich podłożach: *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhodosporidium lusitaniae* i *Scopulariopsis brevicaulis*. Najwięcej – 14 gatunków odnotowano na podłożach z peptonem: Sabourauda i z różem bengalskim (ryc. 1), a nieco mniej 11 gatunków, na podłożu Sabourauda i Czapek-Doxa. Tylko cztery gatunki były zidentyfikowane na podłożach Czapek-Doxa i z różem bengalskim. Tak mała liczba gatunków może świadczyć o rzadko występujących wśród grzybów zdolnościach do wykorzystania nieorganicznego źródła azotu, przy jednoczesnej dużej oporności na inhibitory wzrostu.

Tabela 3. Liczba uzyskanych kolonii grzybów w badanych budynkach w zależności od zastosowanej temperatury inkubacji, podłoża hodowlanego w okresie grzewczym i poza nim
 Table 3. The number of fungal colonies obtained in the studied buildings depending on the applied temperature incubation, the culture medium during the heating season and beyond.

	Tempera- tura inkubacji/ °C	Rodzaj podłoża	Liczba kolonii						Ogółem
			Brak ogrzewania			Okres grzewczy			
			Szkoła I	Szkoła II	Razem	Szkoła I	Szkoła II	Razem	
Drożdżaki	22	Sabourauda	26	15	41	9	12	21	62
		Czapek- Doxa	81	52	133	53	27	80	213
		z różem	15	15	30	25	32	57	87
	Razem								362
	37	Sabourauda	1	1	2	4	1	5	7
		Czapek- Doxa	18	38	56	82	26	108	164
		z różem	0	2	2	9	5	14	16
	Razem								167
Płesniowe	22	Sabourauda	284	352	636	43	70	113	749
		Czapek- Doxa	227	281	508	48	59	107	615
		z różem	204	133	337	46	79	125	462
	Razem								1826
	37	Sabourauda	102	16	118	3	3	6	124
		Czapek- Doxa	154	63	217	11	1	12	229
		z różem	113	2	115	11	3	14	129
	Razem								482
Grzyby łącznie	22	Sabourauda	310	367	677	52	82	134	811
		Czapek- Doxa	308	333	641	101	86	187	828
		z różem	219	148	367	71	111	182	549
	Razem								2188
	37	Sabourauda	103	17	120	7	4	11	131
		Czapek- Doxa	172	101	273	93	27	120	393
		z różem	113	4	117	20	8	28	129
	Razem								653
Suma	22-37	Sabourauda	413	384	797	59	86	145	942
		Czapek- Doxa	480	434	914	194	113	307	1221
		z różem	332	152	484	91	119	210	694
	Razem		2195			662			2857

Podłoże Sabourauda	Podłoże Czapek-Doxa	Podłoże z różem bengalskim
Gatunki zidentyfikowane na wszystkich stosowanych podłożach:		
1. <i>Cladosporium cladosporoides</i> 2. <i>Penicillium chrysogenum</i> 3. <i>Rhodosporidium lusitaniae</i> 4. <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>		
Gatunki wyizolowane z podłoża Sabourauda i Czapek-Doxa:		
1. <i>Aspegillus corneus</i> 2. <i>Cladosporium herbarium</i> 3. <i>Dekkera anomala</i> 4. <i>Klyuveromyces marxianus</i> 5. <i>Klyuveromyces termotolerans</i> 6. <i>Natrassia mangiferae</i> 7. <i>Penicillium griseofulvum</i> 8. <i>Penicillium restrictum</i> 9. <i>Pichia anomala</i> 10. <i>Pichia farinosa</i> 11. <i>Rhizopus nigricans</i>		
	Gatunki wyizolowane podłoża Czapek-Doxa i podłoża z różem bengalskim:	
	1. <i>Aspergillus allahabadii</i> 2. <i>Penicillium cyaneum</i> 3. <i>Penicillium oxalicum</i> 4. <i>Scydalidium infestans</i>	
Gatunki wyizolowane z podłoża Sabourauda i z różem bengalskim:		
1. <i>Aspergillus fumigatus</i> 2. <i>Aspergillus sydowi</i> 3. <i>Candida tropicalis</i> 4. <i>Cladosporium sphaerospermum</i> 5. <i>Debaryomyces hansenii</i> 6. <i>Debariomyces vanrije</i> 7. <i>Geotrichum candidum</i> 8. <i>Mrakia frigida</i> 9. <i>Penicillium aurantio-virens</i> 10. <i>Penicillium commune</i> 11. <i>Penicillium diversum</i> 12. <i>Penicillium nalgiovense</i> 13. <i>Rhodosporidium toruloides</i> 14. <i>Scopulariopsis koningii</i> 15. <i>Thrichophyton concentricum</i> 16. <i>Thrichophyton interdigitale</i> 17. <i>Thrichophyton schenleinii</i>		
Ogółem: 86 gatunków	Ogółem: 37 gatunków	Ogółem: 51 gatunków

Rys. 1. Specyfika występowania wyizolowanych grzybów na zastosowanych podłożach (podkreśleniem zaznaczono gatunki drożdżaków)

Fig. 1. The specificity of the occurrence of isolated of fungi on applied media (emphasis indicated yeasts)

Mniejsza konkurencja o substrat azotowy na podłożu Czapek-Doxa umożliwiła masowe pojawianie się kolonii tego samego gatunku. Aż 42,7% wszystkich uzyskanych w badaniach kolonii wyrosło na tej pożywce, zwłaszcza poza sezonem grzewczym. W okresie grzewczym na wszystkich analizowanych podłożach uzyskano zbliżone wyniki. Łącznie, w obu sezonach, najwięcej grzybów uzyskano na podłożu Czapek-Doxa, chociaż w sezonie grzewczym w szkole II więcej grzybów odnotowano na podłożu z różem bengalskim.

Dodatek inhibitorów wzrostu do podłoża z różem bengalskim nie wpłynął radykalnie na różnorodność i liczebność grzybów, natomiast umożliwił pozyskanie gatunków o wolniejszym wzroście, zwłaszcza drożdżaków. Dodatek różu bengalskiego opóźnia nieco wzrost grzybów strzępkowych [1,12], zwłaszcza *Zygomycetes*. Wytwarzają one grzybnie tylko na koloniach innych grzybów, ale nigdy bezpośrednio w podłożu z zawartością różu bengalskiego i antybiotyku. Obserwacja ta jest ważna, ponieważ grzybnia nieseptowana rośnie szybciej niż septowana czy pączkująca. W związku z tym w hodowlach wielogatunkowych, na podłożach bez inhibitorów wzrostu, *Zygomycetes* „zagłuszają” wzrost innych grzybów zafałszowując wyniki analiz.

W bioaerozolu wewnętrznym mogą znajdować się grzyby bezpośrednio związane z użytkownikami pomieszczeń. Jedną z charakterystycznych cech tych grzybów jest tolerancja na temperaturę ciała ludzkiego [15]. Inkubując próby w temperaturze 37°C, uzyskano 653 kolonie grzybów, co stanowi około 23%.

Teoretycznie, grzyby mogą rosnąć w każdym środowisku i każde podłoże może stanowić dla nich substrat, jednak pojedynczy gatunek nie zawsze dysponuje odpowiednio szerokimi właściwościami enzymatycznymi, w zróżnicowanych parametrach fizyko-chemicznych. Nie udało się określić przynależności gatunkowej 135 izolatów, 91 inkubowanych w 22°C i 44 w 37°C (tab.2). Wyrosłe kolonie grzybów, co prawda rozwinęły grzybnie substratową, ale powietrzna była sterylna. Świadczy to o zahamowaniu metabolizmu przez jakiś czynnik natury chemicznej lub fizycznej.

Podsumowując, chcąc wykorzystać w badaniach monitoringowych jakości bioaerozolu pomieszczeń uzyskane dane i realnie ocenić je pod względem epidemiologicznym należałoby: 1. zastosować pożywki hodowlane o zróżnicowanym składzie pod względem źródła azotu i mikroskładników i 2. zastosować dwie temperatury inkubacji – 22 i 37°C.

LITERATURA

- [1] Baggerman W.I., *A modified rose Bengal medium for the enumeration of yeasts and mould from foods*. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1981,12: 242-247.
- [2] Dynowska M. *Podstawy diagnostyki laboratoryjnej grzybów potencjalnie chorobotwórczych z różnych grup morfologicznych i ekofizjologicznych*. [w:] *Mikologia laboratoryjna. Przygotowanie materiału badawczego i diagnostyka*, pod red. M., Dynowska, E. Ejdyś Wydawnictwo UWM, Olsztyn, 2011, 142-155.
- [3] Ejdyś E., *Environment of school as potential place of interindyvidual transmissions*. Wiadomości Parazytologiczne, 2001, 47(3), 353-358.
- [4] Ejdyś E., *Initial mycological assasment of school facillities*. Mikol. Lek., 2008,15(4), 217-222.
- [5] Ejdyś E.. *Badanie mikobioty pomieszczeń*. [w:] *Mikologia laboratoryjna. Przygotowanie materiału badawczego i diagnostyka*, red. M., Dynowska, E. Ejdyś Wydawnictwo UWM, Olsztyn, 2011, 129-141.
- [6] Ejdyś E., Biedunkiewicz A., *Fungi of the genus Penicillium in scool buildings*. Polish Journal of Environmental Study, 2011, 333-338.
- [7] Ejdyś E., Dynowska M., Biedunkiewicz A., *Zalecenia ogólne i szczegółowe dotyczące pracy w laboratorium mikologicznym*. [w:] *Mikologia laboratoryjna. Przygotowanie materiału badawczego i diagnostyka*, pod red. M., Dynowska, E. Ejdyś Wydawnictwo UWM, Olsztyn, 2011, 166-175.
- [8] Ejdyś E., Dynowska M., Biedunkiewicz A., Sucharzewska E., *An overview of the species of fungi occurring in school rooms – a four-year study*. PJES, 2013, 22(6): 1691-1700.
- [9] Ejdyś E., Michalak J., Szewczyk M., *Yeast-like fungi isolated from indoor air in school buildings and the surrounding outdoor air*. Acta Mycologica, 2009, 44(1): 95-106.
- Flannigan B., Samson R.A., Miller J.D. *Microorganisms in home and indoor work environments*. Taylor and Francis, London, 2001.
- [10] Grinn-Gofroń A., *Airborne Aspergillus and Penicillium in atmosphere of Szczecin, Poland (2004-2009)*. Aerobiologia, 2011, 27, 67-76.
- [11] Jarvis B., *Comparison of improved of rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods*. Journal of Applied Bacteriology, 1973, 36, 723-727.
- [12] Kurnatowska A., *Wybrane zagadnienia mikologii medycznej*. Promedi, Łódź, 1995.
- [13] Moss M.O., *Mycotoxins*. Mycological Research, 1996, 100(5), 513-523.
- [14] Richardson M.D., Warnock D.W., *Grzybyce. Rozpoznawanie i leczenie*. SPRINGER PWN, Warszawa, 1995.
- [15] Zyska B., *Zagrożenia biologiczne w budynku*. Arkady, Warszawa, 1999.

SUITABILITY OF DIFFERENT MEDIA CULTURE OF MUSHROOMS ISOLATED FROM INDOOR AIR

Understanding the full spectrum of taxonomic mycobiota spaces is important for cognitive reasons, epidemiology and prevention. Therefore, the aim of the study was to determine the suitability of selected cultures media of fungi coming from the internal bioaerosol educational premises. Tests with 52 positions taken as standard on the medium with rose bengal, Sabouraud and Czapek-Dox were incubated at temperatures of 22 and 37°C. The greatest diversity of species found on Sabouraud medium - 86 species, the smallest on the ground Czapek-Dox - 37. As many as 14 common species recorded on media Sabouraud and Rose Bengal, while on substrates Czapek-Dox and rose bengal only 4. For all media used also only 4 species were common. The results suggest the need for studies of internal bioaerosol monitoring various substrates breeding and various incubation conditions.