



УДК 58.02+534.8+582.28+771.531.351

ЧОРНІ ДРІЖДЖЕПОДІБНІ ГРИБИ *EXOPHIALA ALCALOPHILA* GOTO ET SUGLY ІЗ ПОШКОДЖЕНОГО ГЕРМЕТИКА В УМОВАХ ВИСОКОЇ ВОЛОГОСТІ ПРИМІЩЕНЬ

ТЕТЯНА КОНДРАТЮК

Анотація. Встановлено, що культура чорних дріжджеподібних грибів у складі комплексу мікроорганізмів, ізольованих із пошкодженого герметика в умовах високої вологості приміщень, належить до *Exophiala* sp. (за морфологічними ознаками). За результатами філогенетичного аналізу за сиквенсами ділянки ITS1/ITS2 ядерної ДНК *Exophiala* sp. віднесено до *E. alcalophila* Goto et Sugly. Даний вид наводиться для України вперше.

Ключові слова: *Exophiala alcalophila*, пошкодження, герметики, морфологія, філогенетичний аналіз, ядерна ДНК, ITS1/ITS2

ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, 01601, Київ – 601, Україна; takbiofak@ukr.net

Вступ

Дослідження мікроскопічних грибів-пошкоджувачів оздоблювальних матеріалів в приміщеннях визнано актуальною проблемою сьогодення, оскільки розвиток біодеструкторів може призводити до виникнення небезпечних для здоров'я людини ситуацій, пов'язаних із надходженням спор грибів з пошкоджених матеріалів у повітря приміщень (МАРФЕНИНА и ФОМИЧЕВА 2007).

У складі угруповань мікроорганізмів, які пошкоджують різноманітні матеріали, трапляються чорні дріжджеподібні гриби (ЧДГ). Так, представники роду *Exophiala* наводяться у комплексі мікроскопічних грибів-пошкоджувачів кам'янистого субстрату (мармуру, будівельних матеріалів) у міському середовищі (ВЛАСОВ 2008), поверхонь матеріалів конструкцій і техніки російського сегмента міжнародної орбітальної космічної станції (АЛЕХОВА и др. 2009) тощо. Вид *E. jeanselmei* var. *jeanselmei* визначено в пробах повітря та бетону з

ознаками руйнації в районах розташування полярних станцій в Західній Антарктиці (ВЛАСОВ и др. 2006). Види роду *Exophiala* поширені у природі – на деревині, що гниє, у ґрунті та воді (САТТОН и др. 2001).

До складу роду *Exophiala* входять численні види потенційних опортуністів чи патогенів, які викликають захворювання у імунокомпетентних людей. Відповідно до санітарних правил (СП 1.3.2322-08 2008) всі види роду *Exophiala* віднесено до IV групи патогенності.

Питання систематики чорних дріжджеподібних грибів (ЧДГ) достатньо складне, оскільки їх характерною особливістю є наявність одноклітинної стадії у вигляді дріжджеподібних клітин. Протягом останнього десятиліття досягнуто значного успіху у таксономії вказаної групи завдяки використанню методів молекулярної філогенії (DE NOOG et al. 2000, 2011). Однією із причин складності ідентифікації ЧДГ є слабка диференціація конідіальних структур і значна варіабельність форм та розмірів клітин. ЧДГ роду *Exophiala* входять до групи анаморфних

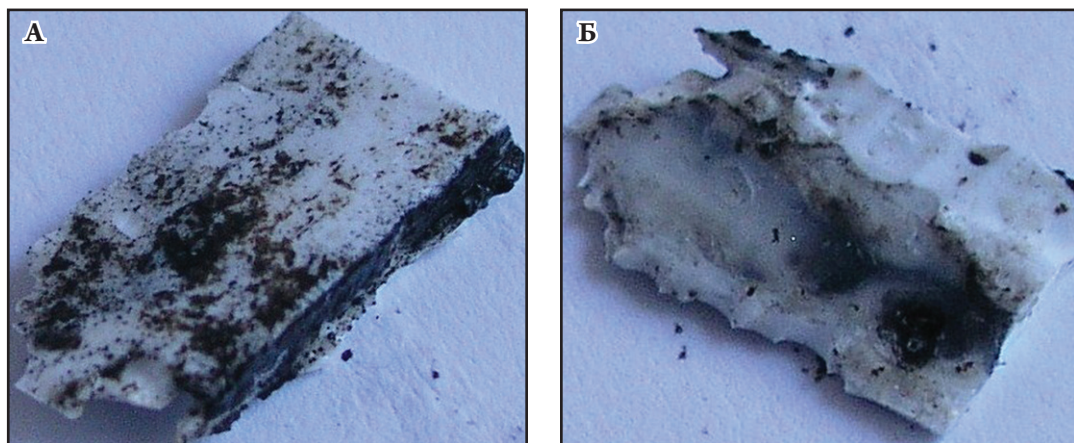


Рис. 1. Проби пошкодженого мікроскопічними грибами полімерного матеріалу (герметика): А – зовнішня сторона; Б – внутрішня сторона проби.

Fig. 1. Specimens of hermetic damaged by microscopic fungi: А – general view of upper side; Б – view from underside.

(мітоспорових). Якщо телеоморфи відомі, вони належать до роду *Capronia*. Види роду *Exophiala* характеризуються властивістю утворювати клітини, які брунькуються, та диморфізмом, тобто здатністю формувати в різних умовах такі два різні морфологічні типи (форми), як «дріжджі» та «гіфи» (DE HOOG *et al.* 2011). Деякі види роду *Exophiala* утворюють фіалідові (верхівкові), ланцюжкові чи симподіальні синанаморфи, що відображають динамічні життєві цикли.

З огляду на широку екологічну амплітуду ЧДГ роду *Exophiala* і здатність представників деяких видів спричиняти патологічні стани людини та тварин, з'ясування їхньої видової приналежності є актуальним.

Матеріали і методи досліджень

Матеріалом для досліджень слугували чисті культури ЧДГ, які підтримуються в колекції мікроскопічних грибів навчально-наукового центру (ННЦ) «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (ФСКУ) та ізольовані з чорних нашарувань на поверхні полімерного (акрилового) шва між стінкою душової kabіни та стіною ванної кімнати приватного будинку в м. Київ (КОНДРАТЮК 2010). Візуально добре помітні пошкодження були зосереджені як на зовнішній, так і на

внутрішній стороні герметика (Рис. 1).

Для виділення та ідентифікації грибів-пошкоджувачів використовували тверді поживні середовища: картопляно-глюкозний агар (КГА), агаризоване середовище Сабуро та сусло-агар (СА) (ГОСТ 9.048-89. ЕСЗКС 1989; SAMSON *et al.* 2004). Ідентифікацію ізольованих чистих культур за морфологічними ознаками здійснювали із використанням визначників грибів (DE HOOG *et al.* 2000; САГТОН *и др.* 2001). Уточнення описів морфології колоній та конідієгенних структур уточнювали із залученням сучасних даних, висвітлених у статтях (LIAN & DE HOOG 2010; DE HOOG *et al.* 2011).

Морфологічну структуру клітин ЧДГ досліджували, використовуючи скануючий електронний мікроскоп JSM-6060LA (після попереднього напилення вуглецем та золотом).

Ядерну ДНК ізолювали із колоній грибів, які культивувалися на КГА з використанням відповідного UltraClean™ Microbial DNA isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., Solana Beach, CA, USA), згідно з протоколами виробника. Отримані нуклеотидні послідовності були порівняні з послідовностями, наявними в базі даних Генобанку (NCBI GenBank) з використанням програми пошуку «МЕГАБЛАСТ».

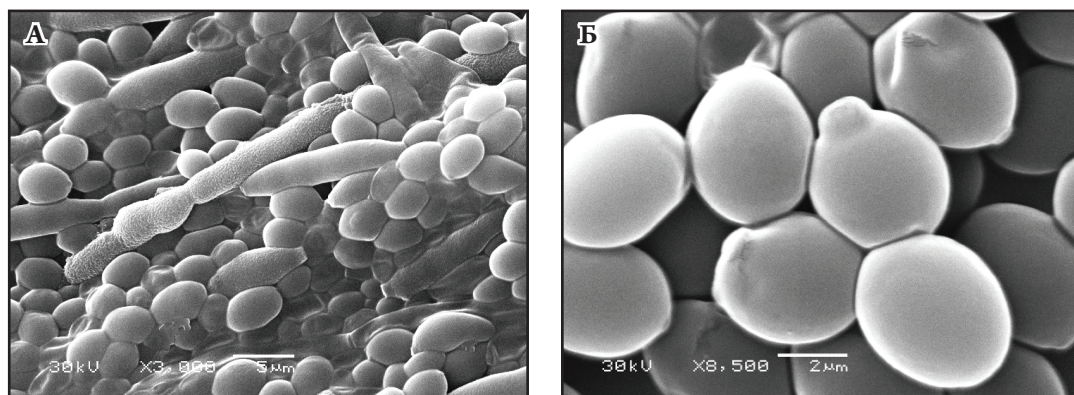


Рис. 2. Чорні дріжджеподібні гриби *Exophiala* sp.: **А** – гіфальні структури гриба на сусло-агарі; **Б** – дріжджеподібні клітини на середовищі КГА.

Fig. 2. Black yeast-like fungi of *Exophiala* sp.: **A** – hyphal structures of fungus at MEA; **B** – yeast-like cells at PDA medium.

Результати та їх обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що пошкодження дослідженого полімерного матеріалу (акрилвмісного герметика) спричинено міцеліальними грибами *Acremonium strictum* W. Gams, *Alternaria longipes* (Ellis et Everh.) E.W. Mason., *Cladosporium sphaerospermum* Penz, *Fusarium poae* (Peck) Wollenw, *Scolecobasidium contractum* M.B. Ellis, дріжджеподібними грибами *Rhodotorula* sp., бактеріями та ЧДГ. Останні ізолювали із накопичувальної культури, отриманої на агаризованому середовищі Сабуро. Переважали в зазначеному комплексі темнопігментовані мікроскопічні гриби.

Чиста культура ЧДГ була попередньо ідентифікована нами як *Exophiala* sp. На КГА та середовищі Сабуро гриби формували гладенькі колонії чорного кольору, діаметром до 2-2,5 см слизистої консистенції. Гіфальні структури спостерігали на СА та КГА. Дріжджеподібні одноклітинні клітини варіювали за формою та розмірами. Переважали дрібні (4-6 мкм) майже сферичні клітини (Рис. 2).

За результатами філогенетичного аналізу за послідовностями ділянок ITS1 та ITS2, а також ділянки 5.8 S ядерної ДНК (скорочено ITS1/ITS2 ділянки), ЧДГ відібраного нами зразка належать до виду *Exophiala alcalophila*

Goto et Sugly.

За морфологічними ознаками ізолювані нами зразки *E. alcalophila* не відрізняються від опису виду, наведеного Г. де Хугом з колегами (DE HOOG *et al.* 2011) за типовими колекційними штамами двохтижневого віку за умов культивування на агаризованому суслі (мальтекстракт агарі – MEA) за температури 24°C. Впродовж першого тижня культивування домінує дріжджеподібна фаза, тоді як пізніше переважає гіфальний морфотип. Перевага будь-якого морфотипу є дуже нестабільною ознакою (DE HOOG *et al.* 2011).

ЧДГ вказаного виду були відомі до останнього часу з Японії та Данії. Гриб *E. alcalophila* був описаний/ізолюваний з двох морфотипів: гіфального та такого, який повністю складався з клітин, що брунькуються. Цим пояснюється те, що спочатку гриб був описаний під двома родовими назвами: *Exophiala* та *Phaeosoccomyces*. Зазначений факт підкреслює також виражені диморфні особливості виду.

Г. де Хуг з колегами (DE HOOG *et al.* 2011) наводять результати опрацювання типової культури *E. alcalophila* (колекція CBS), отриманої з ґрунту на середовищі з мінімальним вмістом поживних речовин при рН 10.4, а також штамів із житлових приміщень, зокрема, з контейнера для мила/ порошку пральної машини, з проб води у

ванні. Штам CBS 122256 був ізольований із шкіри людини з симптомами помірного враження міцеліальними грибами в Данії, але без детальної інформації щодо клінічної картини захворювання.

Х. Ліан і де Хуг (LIAN & DE HOOG 2010) припускають можливий зв'язок між виникненням інфекції шкіри людини та наявністю схожих на чорні дріжджі грибів в умовах приміщень, зокрема ванних кімнат (тобто в умовах «водних систем» приміщень), у яких багато мильних розчинів і середовище збагачене на поживні речовини для грибів. Вказані автори ізолювали з ванних кімнат низку грибів, подібних до чорних дріжджів, які до останнього часу були відомі лише зі шкіри чи нігтів людини. *E. alcalophila* належить до такої ж самої екологічної групи, хоча з нижчою вірулентністю.

Визначення отриманих нами ізолятів ЧДГ стало можливим власне завдяки даним Г. де Хуга з колегами (DE HOOG *et al.* 2011) щодо аналізу результатів ITS-секвенування видів роду *Exophiala*, які були передані до Генобанку в 2011 р. Вказана публікація (DE HOOG *et al.* 2011) може слугувати першим найвагомішим посібником у таксономічній обробці цієї групи, оскільки раніше дані щодо морфологічних і молекулярних ознак видів комплексу *Exophiala* були «розпорошені» у літературі з медичного, ветеринарного та екологічного напрямів.

Висновки

Таким чином, за морфологічними ознаками та результатами філогенетичного аналізу ЧДГ *Exophiala* sp. віднесено нами до виду *E. alkalophila*, який наведено для України вперше.

Подяки

Автор висловлює щире подяку д.б.н., професору Кондратюку Сергію Яковичу за практичну допомогу у проведенні філогенетичного аналізу, колегам із Сунчонського університету (Південна Корея) Джеонг М.-Х. та професору

Хо Дж.-С. – за допомогу у проведенні молекулярно-генетичних досліджень, науковому співробітнику Інституту Ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України Сапсаю В.І. – за допомогу під час проведення електронномікроскопічного дослідження.

Використані джерела

- АЛЕХОВА Т.А., АЛЕКСАНДРОВА А.В., ЗАГУСТИНА Н.А. и др. 2009.** Микроскопические грибы на российском сегменте международной космической станции. *Микология и фитопатология* **43** (5): 377–387.
- ВЛАСОВ Д.Ю. 2008.** Микромитцы в литобионтных сообществах: разнообразие, экология, эволюция, значение. Автореф. дисерт... д-ра биол. наук. Санкт-Петербург.
- ВЛАСОВ Д.Ю., ГОРБУНОВ Г.А., КРЫЛЕНКОВ В.А., ЛУКИН В.В. и др. 2006.** Микромитцы из районов расположения полярных станций в Западной Антарктике. *Микология и фитопатология* **40** (3): 202–211.
- ГОСТ 9.048-89. ЕСЗКС. 1989.** Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. Изд-во стандартов, Москва.
- КОНДРАТЮК Т.А. 2010.** Биопленка на синтетических полимерных материалах в условиях повышенной влажности помещений. *Имунопатология. Аллергология. Инфектология* **1**: 65–66.
- МАРФЕНИНА О.Е., ФОМИЧЕВА Г.М. 2007.** Потенциально патогенные мицелиальные грибы в среде обитания человека. Современные тенденции. В кн.: Дьякова Ю.Т., Сергеева Ю.В. (ред.), *Микология сегодня*. Т. **1**: 235–266. Национальная академия микологии, Москва.
- САТТОН Д., ФОТЕРГИЛЛ А., РИНАЛЬДИ М. 2001.** Определитель патогенных и условно-патогенных грибов (пер с англ. К.Л. Тарасова, Ю.Н. Ковалева). Мир, Москва.
- СП 1.3.2322-08. 2008.** Санитарно-эпидемиологические правила. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Москва.
- DE HOOG G. S., GUARRO J., GENE J., FIGUERAS M.J. 2000.** Atlas of clinical fungi. 2nd ed. ASM Press, Washington.
- DE HOOG G.S., VICENTE V.A., NAJAFZADEH M.J. et al. 2011.** Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Persoonia* **27**: 46–72.
- LIAN, X., DE HOOG, G.S. 2010.** Indoor wet cells harbour melanized agents of cutaneous infection. *Med. Mycol.* **48** (4): 622–628.

SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C. 2004.

Introduction to food and airborne fungi. 7th edition.

Ponsen and Looyen print, Wageningen, Netherlands.

BLACK YEAST-LIKE FUNGI *EXOPHIALA ALCALOPHILA* GOTO ET SUGLY FROM HERMETIC DAMAGED IN CONDITIONS OF INDOOR HIGH HUMIDITY

TETYANA KONDRATYUK

Abstract. From morphological study it was shown that culture of black yeast-like fungi of microorganism complex isolated from hermetic damaged in conditions of indoor high humidity belongs to *Exophiala* sp. It was identified as *E. alcalophila* Goto et Sugly after results of phylogenetic analysis based on sequences of the internal transcribed spacer 1 (ITS1), the 5.8 S gene and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) rDNA. *E. alcalophila* is for the first time recorded for Ukraine.

Key words: *Exophiala alcalophila*, hermetic, damages, morphology, phylogenetic analysis, nuclear DNA, ITS1/ITS2

Educational and Scientific Centre «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13 Volodymyrs'ka str., 10601, Kyiv, Ukraine; takbiofak@ukr.net