

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра,  
Главный государственный  
санитарный врач  
\_\_\_\_\_ М.И. Римжа  
5 января 2006 г.  
Регистрационный № 127-1106

**ОРГАНИЗАЦИЯ СТАЦИОНАРНЫХ И ВРЕМЕННЫХ ТОЧЕК  
МОНИТОРИНГА ПЫЛЬЦЫ РАСТЕНИЙ И СПОР ГРИБОВ  
В АТМОСФЕРНЫХ АЭРОЗОЛЯХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканский научно-практический  
центр гигиены

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. С.М. Соколов, канд. мед. наук Т.Е. Науменко,  
канд. биол. наук Т.Д. Гриценко, канд. геол.-минерал. наук В.П. Самодуров,  
канд. биол. наук В.Л. Шалабода, С.Т. Андрианова, Л.М. Шевчук,  
А.Е. Пшегорода

Минск 2007

Необходимость мониторинга аэропаленологической обстановки вызвана значительным ростом заболеваний аллергическим ринитом (поллинозом). В настоящее время количество страдающих аллергическим ринитом распределено по сезонам года: весной аллергический ринит в основном вызывают цветущие деревья и кустарники, летом — злаки и другие травы, а ближе к осени — сорняки. Реакция пациентов на цветение растений по сезонам года влечет за собой необходимость усиления мониторинга качественного и количественного состава «пыльцевого дождя», выявления сезонной и суточной динамики пыления основных аллергенных таксонов, изучения факторов, влияющих на формирование спорово-пыльцевых спектров. Разработка календарей пыления и существующая система оповещения населения и медицинских учреждений об аллергенной обстановке в городах позволит людям, страдающим выраженными проявлениями поллиноза, избежать или снизить тяжесть течения болезни.

Целесообразно организовать сеть аэропаленологических лабораторий во всех областных центрах республики, при этом на первом этапе возможно применять портативные пылеуловители и использовать косвенные методы исследования пыльцевого дождя.

В настоящей инструкции представлены:

- организация стационарных и временных точек наблюдения;
- описание прямых и косвенных методов аэропаленологических исследований;
- стационарные и портативные пылеуловители, используемые в аэропаленологических исследованиях;
- оборудование рабочего места для ведения стационарных аэропаленологических исследований;
- ориентировочный опасный уровень воздействия пыльцы растений и спор грибов в атмосферном воздухе;
- система информирования населения об опасных ситуациях в отношении пыльцевого дождя.

В инструкции изложены возможности, преимущества и сфера применения каждого метода и представлено описание пылеуловителей, их технические характеристики, правила эксплуатации, перечень оборудования и расходных материалов.

Инструкция предназначена для широкого круга пользователей — научно-исследовательских лабораторий, лабораторий системы здравоохранения, осуществляющих мониторинг окружающей среды.

В ранее разработанной нами Инструкции по применению «Методика аэробиологических исследований пыльцы растений и спор грибов для составления календарей пыления» (рег. № 111-1005, утв. 28.12.05) представлена аналитическая процедура (методика) аэропаленологических наблюдений, включающая:

- выбор и конструирование пылеуловителя;
- апробирование, градуировку и определение эффективности прибора;

- установку и методы работы с пылеуловителем;
- подготовку сред для улавливания частиц;
- сбор пыльцы растений и спор грибов, их идентификацию, количественное определение при визуальном подсчете в поле зрения оптического или (и) электронного микроскопа;
- перечень пособий-определителей для идентификации и подсчета пыльцы растений и спор грибов в препаратах;
- перечень основных аллергенных таксонов, наблюдаемых на европейских станциях мониторинга пыльцы растений и спор грибов и произрастающих в республике;
- верификацию латинских и российских названий растений и плесенных грибов;
- рекомендации по составлению календарей пыления.

### **Термины и определения**

*Аэропалинология* — область современной биологии, изучающая состав и закономерности формирования пыльцевого дождя.

*Гравиметрическая ловушка* — осаждение частиц под действием силы тяжести.

*Импакторная ловушка* — частицы перемещаются с потоком воздуха и сталкиваются с поверхностью. Бывают 2 видов: естественные (частицы перемещаются ветром) и волюметрические (принудительно прокачивается воздух с заданной скоростью).

*Поллиноз* — аллергическое заболевание, вызываемое пылью растений, проявляющееся клинически в виде сезонного аллергического ринита, конъюнктивита и иногда сопровождающееся развитием бронхиальной астмы и другими симптомами.

*Пыльцевой дождь* — совокупность пыльцы растений и спор грибов, циркулирующих в атмосфере.

*PM (Particulate Matter)* — международное обозначение мелкодисперсных частиц аэрозолей. Индекс в нижней части обозначает размер в микронах (PM<sub>2,5</sub>, PM<sub>10</sub>).

*Таксон* (биол.) — термин применяется для обозначения систематических единиц любого ранга, принят на Международном ботаническом конгрессе в 1950 г. (ед.ч. taxon, мн.ч. taxa).

### **Методы аэропалинологических наблюдений**

Мониторинг содержания пыльцы растений и спор грибов в атмосферном воздухе рекомендуется проводить прямыми и косвенными аэропалинологическими методами.

#### ***Прямые методы мониторинга***

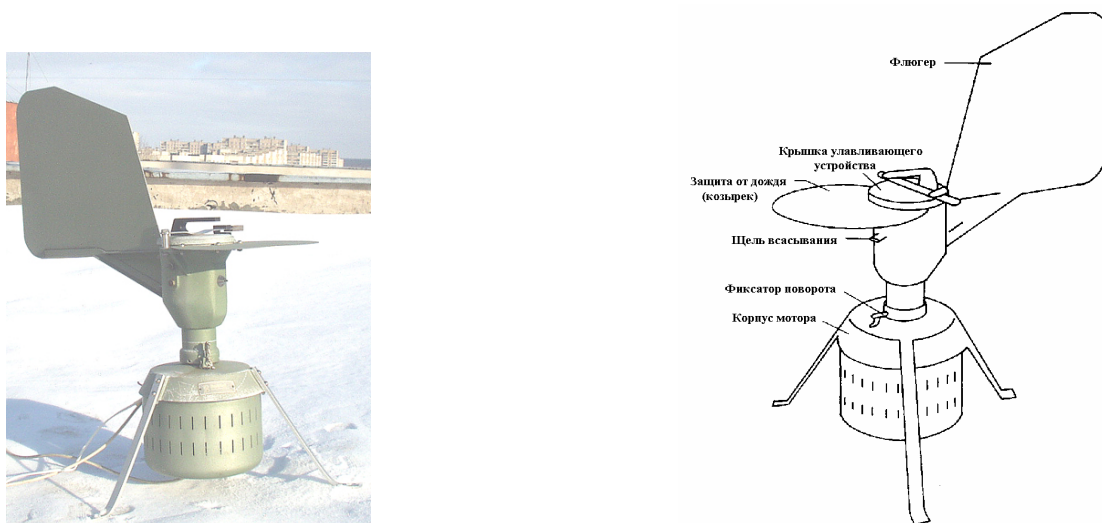
Прямые аэропалинологические исследования основаны на методе отбора микрочастиц аэрозолей *Particulate Matte (PM)* с использованием пылеуловителей с различными типами улавливания: импакторные, гравиметрические, *in*раст-волюметрические ловушки с контролируемым объемом воздуха, прокачиваемым через пылеуловитель. Эти методы

наблюдения являются основными поставщиками данных для построения календарей пыления и компьютерного прогнозирования волн пыления в целом для города. Метод прямого аэропалинологического анализа аэрозолей непосредственно определяет концентрацию пылицы и спор в составе аэрозолей и позволяет идентифицировать пыльцу лабораторными методами с помощью оптической и сканирующей электронной микроскопии.

Существует три основных направления для организации работ по мониторингу в республиканских масштабах: обеспечение оборудованием (пыльцеуловители), создание сети специализированных лабораторий по анализу концентрации и состава пылицы и разработка нормативно-методической базы проведения исследований.

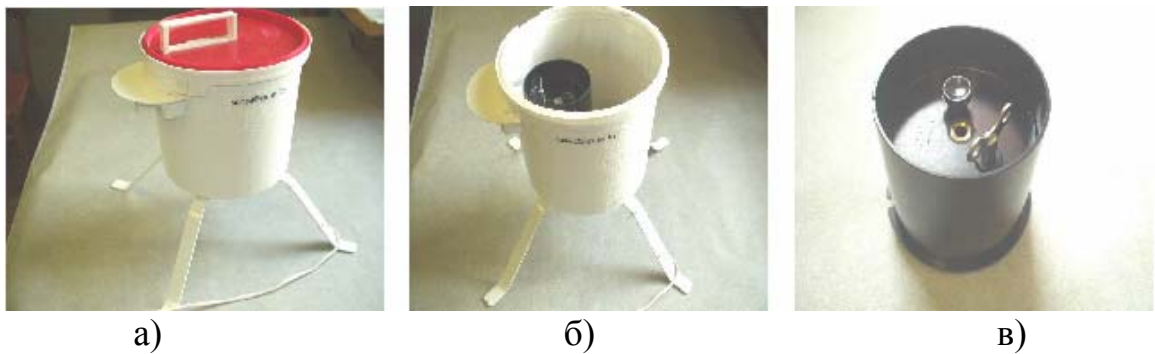
### 1. Организация стационарной точки наблюдения

Исследователи западных стран пользуются несколькими типами ловушек. В Европе исследователи отдают предпочтение *impact*-волюметрическим ловушкам, в которых осаждение частиц происходит с прокачкой воздуха. Они удобны в обслуживании, характеризуются легкой подготовкой проб к анализу в микроскопе и хранению препаратов. В крупных исследовательских центрах налажен производственный выпуск таких ловушек.



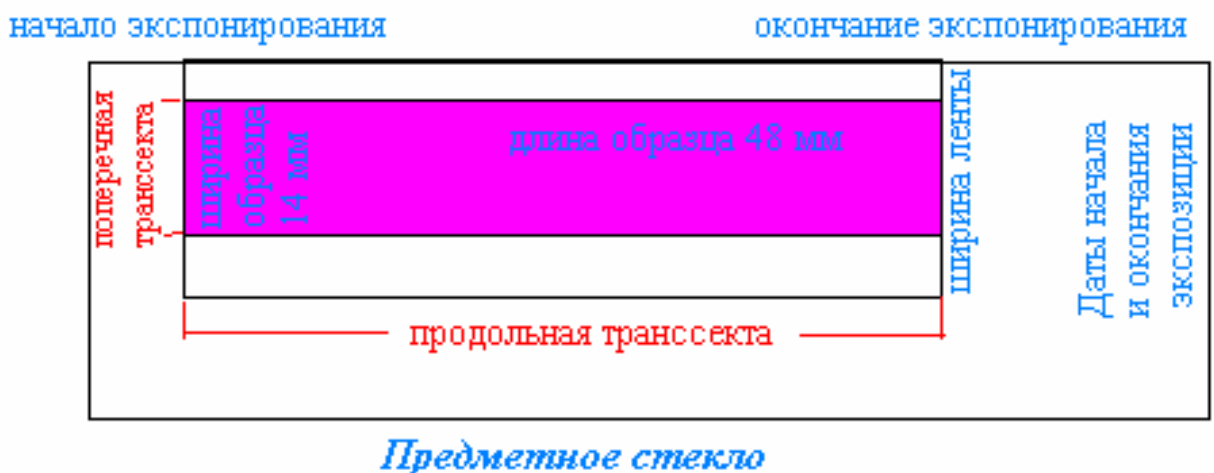
**Рис. 1. Пыльцевая *impact*-волюметрическая ловушка и схема ее строения**

Пыльцевая *impact*-волюметрическая производственная ловушка предназначена для изучения биологических частиц и частиц пыли в составе атмосферного воздуха (т.е. для аэриобиологического мониторинга атмосферных аэрозолей) и используется для научных исследований в биологии, медицине, сельском хозяйстве и метеорологии. Принцип работы ловушки состоит в прокачивании через нее воздуха, содержащего аэрозоли, при этом микрочастицы прилипают к липкой поверхности улавливающей ленты.



**Рис. 2. Волюметрическая импакторная экспериментальная ловушка: а) ловушка в сборе; б) крышка ловушки снята; в) часовой механизм МЧН**

Пыльцеуловитель, сконструированный на базе РНПЦ гигиены (рационализаторское предложение № 1359 от 28.11.05), имеет характеристики сбора пыли, аналогичные импортным. Правила установки пылевой ловушки изложены в инструкции «Методика аэробиологических исследований пыли растений и спор грибов для составления календарей пыления» № 111-1005 от 28.12.05. В этой же инструкции описана методика определения эффективности работы пыльцеуловителя, подготовка сред и ленты для улавливания частиц. Создана методическая база для обучения сотрудников методам ведения аэропалинологического анализа. Волюметрическая импакторная экспериментальная ловушка не имеет ориентации навстречу ветровому потоку, ее образец несколько короче. Скорость вращения барабана 1,8 мм/ч против 2 мм у стандартной производственной ловушки. Длина суточного образца составляет 42 мм против 48 мм у стандартной производственной ловушки. В остальном принцип работы и условия эксплуатации экспериментальной и стандартной производственной ловушки похожи.



**Рис. 3. Внешний вид препарата для просмотра и длительного хранения, полученный при помощи пылевых волюметрических импакторных ловушек**

**Оборудование рабочего места для ведения стационарных аэропалинологических наблюдений**

1. Стол.
2. Микроскоп МБИ-3 (или любой другой, позволяющий изучать препараты на просвет при увеличении в 400 раз и более).
3. Электроплита для приготовления препаратов.
4. Стекла предметные 25x75x1 мм
5. Стекла покровные 24x50 мм
6. Стекла покровные 24x24 мм
7. Пинцеты
8. Мензурка 50 мл.
9. Мензурка 100 мл.
10. Мензурка 250 мл.
11. Мензурка 500 мл.
12. Воронка лабораторная В-130-250.
13. Воронка лабораторная В-36-50.
14. Стакан лабораторный высокий ВН-1-50 мл с дел.
15. Стакан лабораторный высокий ВН-1-100 мл с дел.
16. Стакан низкий со шкалой 50 мл ПП.
17. Стакан низкий со шкалой 100 мл ПП.
18. Стакан низкий со шкалой 500 мл ПП
19. Стакан низкий со шкалой 1000 мл ПП.
20. Бюксы лабораторные с притертой крышкой для хранения смесей.
21. Карандаш по стеклу синий/красный.
22. Фильтры обеззоленные «белая лента» d-180 мм.
23. Пипетки лабораторные.
24. Игла препировальная.
25. Коробки для хранения препаратов.
26. Кисточки беличьи или колонковые разного диаметра для нанесения клеящей смеси на ленту.

## **2. Организация временной точки наблюдения**

Обычно для аэропалинологических исследований используются стационарные ловушки пыльцы. Однако использование таких ловушек возможно только на станциях наблюдения. Для аэропалинологического мониторинга необходима носимая волюметрическая ловушка, удобная для транспортировки и использования в полевых условиях. Полевые волюметрические импакторные ловушки для аэропалинологических исследований не выпускаются ни в странах СНГ, ни в Западной Европе.

### ***Полевая волюметрическая импакторная ловушка***

Сконструирована и создана полевая (переносная) волюметрическая impact-ловушка для мониторинга аэропалинологической обстановки в разных точках города (подготовлено и подано рацпредложение). Забор аэрозолей осуществляется в течение 3–4 ч в оптимальные сроки пыления (с 12 до 16 ч дня) по контрольным точкам наблюдений. Данный подход позволяет исследовать локальные вариации в распределении пыльцы и спор по разным районам населенного пункта.



а)



б)

**Рис. 4. Полевая волюметрическая импакторная ловушка:** а) общий вид ловушки; б) детали камеры для улавливания пылицы

В конструкции ловушки использован насос заводского изготовления с объемом заборника  $267,517 \text{ см}^3$ . Апробация ловушки показала, что пыльца и другие компоненты аэрозолей распределяются в центре предметного стекла, в круге диаметром 6 мм, а остальная поверхность остается чистой. Опыт использования ловушки показывает, что оптимальным является применение 75 циклов прокачки воздуха, что составляет 20 л воздуха в одной точке наблюдений.

Улавливание частиц происходит на предметное стекло, покрытое глицерино-желатиновой смесью (стекло покрывается смесью не полностью — остаются свободными края). Воздух через ловушку прокачивается вручную. После экспозиции стекла крепятся в коробке, приспособленной для переноски. В лабораторных условиях образцы окрашиваются, закрываются покровными стеклами и готовы для изучения и длительного хранения. Образцы изучаются в световом микроскопе по схеме, представленной в Инструкции по применению «Методика аэриобиологических исследований пыльцы растений и спор грибов для составления календарей пыления» (рег. № 111-1005, утв. 28.12.05). При проведении сравнительного анализа с контрольными образцами были получены корректные результаты. Эта ловушка позволяет проводить мониторинг по определенным точкам в определенное время и оценивать содержание пылицы в  $1 \text{ м}^3$  воздуха в различных точках города в течение дня.

#### ***Портативные ловушки для локального мониторинга***

1) *Стандартная гравиметрическая ловушка* используется во всех палинологических лабораториях мира для изучения пылевого осадка. В комплект ловушки входят:

- чашка Петри  $d=80 \text{ мм}$ ;
- предметное стекло  $24 \times 75 \times 1 \text{ мм}$ ;
- покровное стекло  $24 \times 50 \text{ мм}$ ;
- глицерино-желатиновая смесь;
- сафронин или фуксин.

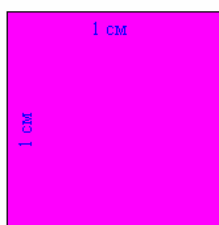
Смесь наносится на предметное стекло, помещается в открытую чашку Петри и устанавливается на высоте от 1,5 до 20 м. Экспонирование продолжается от нескольких часов до нескольких суток. Высота установки и длительность экспозиции определяются потребностями исследования.

Налипание частиц происходит под воздействием силы тяжести. После экспонирования чашка закрывается, образец в лабораторных условиях вынимается из чашки Петри, окрашивается фуксином и закрывается покровным стеклом (стекло покровное 24x50 мм). Образец готов для просмотра и длительного хранения. Сбоку образца крепится этикетка с датами начала и конца экспозиции. Микроскопирование выполняется в световом микроскопе при увеличении 400 последовательными продольными транссектами. Подсчитываются все частицы препарата. Проводится их таксономическая идентификация. Данные записываются в рабочие журналы. Количество частиц делится на площадь препарата, что отражает количество пылевого осадка на  $1 \text{ см}^2$ . Эти результаты заносятся в таблицы, на основании которых строятся графики и календари пыления.

2) *Портативная гравиметрическая ловушка* для изучения в световом микроскопе комплектуется:

- коробкой для хранения образца;
- пластилином;
- предметным стеклом 10x10 мм;
- покровным стеклом 10x10 мм;
- глицерино-желатиновой смесью;
- сафронином или фуксином.

Подготовка к работе проводится по аналогии со стандартной гравиметрической ловушкой. При использовании портативной ловушки сразу получаем содержание пыли на  $1 \text{ см}^2$  поверхности за определенную единицу времени (час, сутки, декаду).



**Рис. 5. Портативная гравиметрическая ловушка для изучения образца в световом микроскопе (поверхность покрыта глицерино-желатиновой смесью)**

3) *Портативная гравиметрическая ловушка* для электронного микроскопирования внешне похожа на предыдущую ловушку (рисунок 4), за исключением того, что используется двухсторонняя клейкая лента (Scotch-3M) вместо глицерино-желатиновой смеси. В комплект ловушки входят:

- коробок для хранения образца;
- пластилин;
- предметное стекло 10x10 мм;
- двухсторонняя клейкая лента (Scotch-3M).

Клейкая лента клеится на предметное стекло, которое помещается в открытый коробок для хранения образца на подложку из пластилина и устанавливается на высоте от 1,5 до 20 м. Экспонирование продолжается от



нескольких часов до нескольких суток. Высота установки и длительность экспозиции определяется потребностями исследования. Налипание частиц происходит под воздействием силы тяжести на клейкую поверхность ленты. Коробок закрывается, при этом пластилин не позволяет образцу перемещаться внутри коробка. Образец в лабораторных условиях вынимается из коробка, помещается на столик для электронного микрофотографирования, напыляется углем и золотом и готов для просмотра. Длительному хранению не подлежит. После просмотра уничтожается.

4) *Портативная импакторная ловушка* для электронного микрофотографирования комплектуется:

- столиком для электронного микроскопа;
- двухсторонней клейкой лентой (Scotch-3M).



**Рис. 6. Портативная импакторная ловушка для изучения образца в сканирующем электронном микроскопе (на поверхность столика наклеена двухсторонняя клейкая лента Scotch-3M)**

Клейкая лента размером 10x10 мм клеится на столик, который экспонируется на открытом воздухе на высоте от 1,5 до 20 м. Столик устанавливается под углом 45° к ветровому потоку. Экспонирование продолжается от нескольких часов до нескольких суток. Высота установки и длительность экспозиции определяются потребностями исследования. Частицы под воздействием силы ветра налипают на клейкую поверхность ленты. Принято считать, что мелкие частицы, в том числе пыльца и споры, перемещаются почти горизонтально к поверхности земли. Поэтому ловушки, установленные навстречу ветру (импакторные), будут более достоверно отражать содержание пыльцы и спор в воздухе, чем ловушки, расположенные горизонтально, на которые частицы осаждаются под воздействием силы тяжести (гравиметрические).

Изучение образцов в сканирующем электронном микроскопе позволяет более подробно проводить исследование материала по сравнению со световым микроскопом. В сканирующем электронном микроскопе можно отмечать мелкие детали скульптуры изучаемых объектов, не заметные в световом микроскопе, более надежно проводить таксономическую идентификацию. При использовании сканирующего электронного микроскопа (СЭМ, или SEM) подготовка пробы к анализу проводится следующим образом. Образец (столик

с липкой лентой) поместить в установку вакуумного напыления ВУП-2 и напылить углем (5 с), затем поместить в установку вакуумного напыления JFC-1100 и напылить золотом в течение 3–5 мин. Напыление проводится для нанесения проводящей пленки на поверхность образца. Двойное напыление углем и золотом позволяет получить более контрастное изображение при больших увеличениях на рыхлом материале.

При анализе препарат рассматривается в электронном микроскопе на разных увеличениях от 20 до 20 000, в зависимости от размера изучаемых частиц. Размер частиц определяется по отношению к измерительной линейке в нижней части экрана. Изучается вся поверхность препарата последовательными продольными или поперечными транссектами. Данные записываются в рабочий журнал. Площадь препарата составляет 1 см<sup>2</sup>. Полученный результат отражает содержание пыльцы и спор в 1 см<sup>2</sup> осадка. Эти результаты заносятся в таблицы, на основании которых строятся графики и календари пыления.

Для аэропалинологических исследований применяются методы обработки препаратов, исключая сильное химическое воздействие на объект исследования. В первую очередь следует назвать метод Вудхауза. Этот метод применяется также для изготовления эталонных (контрольных) препаратов пыльцы растений. По методу Вудхауза препараты готовятся следующим образом: свежую пыльцу фиксируют каплей спирта на предметном стекле, а затем заключают в подкрашенную метиленовой зеленью глицерино-желатиновую смесь; или фиксируют спиртом, подкрашенным фуксином, и заключают в чистую глицерино-желатиновую смесь. Однако аэропалинологи стараются избегать спиртового воздействия на препарат, поэтому чаще всего при исследованиях экспонированную поверхность ловушки заключают в чистую или подкрашенную фуксином (сафронином) глицерино-желатиновую смесь. Этим же методом пользуются при изготовлении учебных препаратов по идентификации пыльцы для целей аэропалинологии: сухие пыльцевые зерна заключаются в подкрашенную фуксином глицерино-желатиновую смесь.

В аэропалинологических исследованиях используют следующие реактивы:

1. Желватол (поставляется в комплекте к ловушке Буркарда).
2. Глицерин.
3. Желатин.
4. Фенол.
5. Сафронин или фуксин (основной).
6. Воск пчелиный.
7. Вазелин.

При использовании всех перечисленных портативных ловушек для локального мониторинга проводят аэропалинологические исследования и строят сначала графики, а затем календари пыления основных наблюдаемых аллергенных таксонов. Методы построения изложены в инструкции «Методика аэробиологических исследований пыльцы растений и спор грибов для составления календарей пыления» №111-1005 от 28.12.05.

### ***Косвенные методы мониторинга***

Косвенные методы мониторинга делятся на наземные методы и методы зондирования (аэрометоды и методы космического зондирования). Основным наземным косвенным методом является фенологический метод наблюдения за этапами формирования пыльников и этапами раскрытия листа. Эти этапы связаны с пиками пыления и определяют начало пыления на данной территории. На рисунке 7 приведены основные визуальные признаки для определения фаз образования листвы и цветения. Фенологический метод прост и доступен для использования широким кругом исследователей. На основании этого метода можно прогнозировать наступление пика пыления, что позволит населению принять упреждающие меры. Этот альтернативный методический подход позволяет воссоздать данные палинологического мониторинга в масштабах отдельных регионов (отдельные дворовые территории, микрорайоны города и др.).

Фенологический метод является косвенным, он может быть использован для приближенного определения основного пика пыления растений данного вида на данной территории, но расчет концентрации пыльцы в составе аэрозолей этим методом не проводится.

	10-04-2006. Состояние сережек до начала пыления
	15-04-2006
	19-04-2006. Приближение начала пыления. Наблюдается изменение состояния сережек

	<p>25-04-2006. Приближение пика пыления</p>
	<p>30-04-2006. Дальнейшее приближение начала пыления. Отмечается начало набухания почек</p>
	<p>05-05-2006. Начало пика пыления. Появление листа и начало раскрытия пыльников на сережках</p>
	
	

**Рис. 7. Определение пика пыления косвенным методом (фазы формирования листа и цветения) на примере Березы повислой (*Betula pendula* Ehrh)**

Фенологический метод применяется профессионалами и натуралистами-любителями. Особенно широко данный метод используется аэропалинологами США и Австралии с привлечением местного населения, что позволяет почти в условиях реального времени разместить информацию о предстоящем пылении растений на Internet-сайтах.

Сотрудниками центра составляется краткая инструкция для проведения фенологических наблюдений, ориентированных на регистрацию пиков

пыления основных древесных растений на территории Беларуси, которая будет размещена на Web-сайте РНПЦ гигиены.

Другой методический подход связан с использованием методов зондирования. Наблюдение за появлением листвы и распространением озелененной зоны, связанной с пылением древесных растений, может быть осуществлено методами ГИС-технологий на основе анализа космических снимков. В Беларуси доступными для анализа являются данные спутников NOAA (разрешение снимков 1 км/пиксел), TERRA (разрешение 36 км, 1 км и 500 м/пиксел), а также российского спутника МЕТЕОР (разрешение 35 м/пиксел). Преимуществом данного метода является наблюдение и анализ больших территорий. Недостатком метода является частая закрытость анализируемой территории облачностью, особенно в весеннее время, а также изменчивость наблюдаемой картины в разное время суток и при разных погодных условиях.

Оптимальным, на наш взгляд, является применение всех методик мониторинга: фенологических наблюдений, дистанционного зондирования и аэропалинологических наблюдений.

#### **Система информирования населения об опасных ситуациях в отношении пыльцевого дождя**

1. Создание и поддержание информационной страницы на Web-сайте РНПЦ гигиены для информирования посетителей сайта: методика, календари пыления, градация степени «пыльцевого дождя», прогноз, пояснительная записка.

2. Издание памяток.

3. Публикация календаря пыления в периодической печати.

Таблица

#### **Ориентировочный опасный уровень воздействия пыльцы растений и спор грибов в атмосферном воздухе**

Количество пыльцевых зерен в м <sup>3</sup> воздуха				Градация уровней опасности	Количество людей, страдающих аллергией (%)	Наличие и выраженнос ть реакции
деревья	злаки	сорняки	споры грибов			
0	0	0	0	Отсутствует	0	Реакция отсутствует у населения, чувствительно го к данному виду пыльцы
1–14	1–4	1–9	10–140	Низкий	1–25	Реакция присутствует у населения, чрезвычайно чувствительно го к данному виду пыльцы

15–89	5–19	10–49	150–890	Умеренный	26–50	Реакция присутствует у населения, чувствительного к данному виду пыльцы
90–1499	20–199	50–499	900–14990	Высокий	51–75	Реакция присутствует у большинства населения с любой чувствительностью к данному виду пыльцы
>1500	>200	>500	>15000	Очень высокий	>76	Реакция присутствует почти у всего населения с любой чувствительностью к данному виду пыльцы. У чрезвычайно чувствительного населения наблюдаются серьезные признаки заболевания