

УДК 579.222

И. А. Гончарова¹, Е. Н. Сабадах², А. М. Тригубович¹, Н. В. Черная²¹Белорусский научно-исследовательский институт документоведения
и архивного дела²Белорусский государственный технологический университет**МИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОМЫШЛЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ,
КОНТАМИНИРОВАННЫХ МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ**

В статье приводится алгоритм проведения микологического анализа промышленных материалов, включающий фотофиксацию внешнего вида объекта; выявление очагов плесневого поражения по высокой степени обсемененности микромицетами и наличия явного видового доминирования; выделение и идентификацию изолятов; изучение штаммовых особенностей агентов биоповреждения по отношению к факторам внешней среды; оценку характера воздействия плесневых грибов на материалы в моделируемых условиях. Показано, что *Aspergillus carbonarius* хорошо утилизирует различные виды целлюлозы в качестве единственного источника углерода, присутствие макулатуры не оказывает существенного влияния на скорость роста гриба, но значительно усиливает пигментообразование. Выявлено, что под действием грибных метаболитов значительно возрастает влагопоглощающая способность полимерной пленки, особенно значительно в начальной фазе развития очага плесневого поражения, когда его признаки не всегда заметны. Приводятся наглядные примеры интерпретации результатов анализа.

Ключевые слова: биоповреждение, плесневые грибы, микобиота, микологический анализ, полимерная пленка, бумага, изменение свойств материала.

I. A. Goncharova¹, E. N. Sabadakh², A. M. Trigubovich¹, N. V. Chernaya²¹Belarusian Research Institute of Document Science and Archival Affairs²Belarusian State Technological University**MYCOLOGICAL ANALYSIS OF INDUSTRIAL MATERIALS
CONTAMINATED BY MICROSCOPIC FUNGI**

The article provides an algorithm for the mycological analysis of industrial materials, including photofixation of appearance; identification of foci of mould damage by a high degree of dissemination by micromycetes and the presence of obvious species dominance; isolation and identification of isolates; the study of strain characteristics of biological damage agents in relation to environmental factors; assessment of the nature of the impact of molds on materials in simulated conditions. It has been shown that *Aspergillus carbonarius* well utilizes various types of cellulose as the only carbon source; the presence of waste paper does not significantly affect the fungal growth rate, but significantly enhances pigmentation. It was established that under the action of fungal metabolites, the water-absorbing ability of the polymer film significantly increases, especially significantly in the initial phase of the development of the focus of mold damage, when its signs are not always noticeable. Illustrative examples of interpretation of the analysis results are given.

Key words: biodeterioration, fungi, mycobiota, mycological analysis, polymer film, paper, change in material properties.

Введение. Большинство промышленных материалов, включая композиционные материалы на полимерных связующих, могут подвергаться процессам биоповреждения. Проблема изучается на протяжении многих десятилетий, однако ее специфика такова, что в связи с ускоренным развитием технологий факторы воздействия и среды обитания микроорганизмов видоизменяются, как видоизменяются и сами микроорганизмы. Экономические потери и негативный социальный эффект вследствие плесневого поражения материалов и изделий могут достигать внушительных размеров [1]. Действие экзометаболитов плесневых грибов приводит к изменению

физико-механических свойств материалов. Грибы ухудшают внешний вид пораженных объектов, обесцвечивая их поверхность или образуя на них пятна. Разрастаясь по поверхности, они вызывают функциональную деградацию материалов под действием продуктов обмена веществ.

Присутствие плесневых грибов может быть причиной заболеваний человека с широким спектром патологических проявлений [2].

Основная часть. Для выделения и исследования грибов из очагов плесневого поражения использовали агаризованную среду Чапека. Различную активность воды создавали путем добавления

в агаризованную питательную среду соответствующего количества хлорида натрия [3].

Зону пигментации вокруг колоний определяли через 10 сут культивирования при температуре 28°C как среднее значение двух измерений во взаимоперпендикулярных направлениях.

Влияние композиционного состава бумаги на пигментообразование определяли по диаметру зоны потемнения образцов бумаги вокруг точки посева спор тест-культуры. Наличие грибного мицелия определяли путем микроскопирования образцов в отраженном свете. Образцы бумаги изготавливали с применением целлюлозы сульфитной бленной хвойной по ГОСТ 3914–89Е, целлюлозы сульфатной бленной хвойной по ГОСТ 9571–89Е, целлюлозы сульфатной из смеси лиственных пород древесины по ГОСТ 28172–89Е, макулатуры сборной по ГОСТ 3989–89Е на листоотливном аппарате «Рapid-Кеттен» (Германия) по стандартной методике, сушку образцов бумаги проводили при температуре 110–115°C, термообработку – при 125–130°C в течение 1 мин.

Воздействие плесневых грибов на свойства пленкообразователей оценивали после инкубации образцов с агаровой сеткой, инокулированных спорами грибов, выделенных из очагов плесневого поражения красочных покрытий [4]. Влагопоглощение полимерной пленки определяли по ГОСТ 21513.

Очаги плесневого поражения обычно обнаруживаются на поздних стадиях, когда они проявляются в виде четко выраженных грибных колоний или бесформенных скоплений гиф, пигментных пятен, окрашенного спорowego налета. Однако на ранних стадиях колонизации материала грибные гифы практически незаметны, кроме того, споровый налет можно принять за пылевые частицы и наоборот. Поэтому большое значение имеет детальный осмотр пораженного объекта с фотофиксацией общего вида и участков взятия проб для исследования (рис. 1).

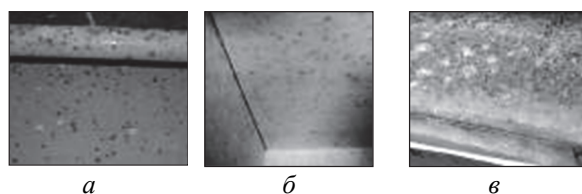


Рис. 1. Материалы с внешними признаками плесневого поражения:

a – лакокрасочные покрытия с грибными колониями; *б* – картон, загрязненный плесневыми грибами; *в* – картонное изделие с загрязнением биогенной природы (побелка, сажа)

Установить причину и точные сроки контаминации часто бывает весьма проблематично

из-за способности спор микромицетов длительно сохранять жизнеспособность даже в экстремальных условиях. Решению этой проблемы способствует микологический анализ.

Вначале проведения микологического анализа необходимо установить само наличие плесневого поражения, т. е. колонизацию материалов одним или несколькими видами грибов. С этой целью проводят высеив проб на питательные среды, ограничивающие рост грибных колоний. При использовании для выделения богатых сред обычно наблюдается преимущественное развитие «посторонних» грибов, которые отличаются высокой ростовой активностью, но не способны развиваться в специфических экологических условиях промышленных материалов.

Сравнение различных методов выделения плесневых грибов из пылевидных налетов показало, что наиболее часто используемое изучение микобиоты проб в лаборатории традиционным методом серийных разведений делает микологический анализ довольно трудоемким и малоинформативным. Упростить работу и облегчить интерпретацию результатов позволяет высеив проб в чашки Петри с питательными средами диаметральными штрихами. Это можно сделать непосредственно ватными тампонами (гигиеническими палочками), которыми брали пробы, или путем распределения капли водной суспензии пробы стеклянной палочкой. Оптимальное количество штрихов – четыре. Наличие свободного пространства между штрихами позволяет выявить доминирующие культуры грибов, которые и являются основными колонизаторами, а также сопутствующую микобиоту пылевых частиц. Для очагов плесневого поражения характерно появление по штрихам четких полос, образованных колониями с одинаковыми культуральными признаками. Отличительным признаком агента плесневого поражения является явное доминирование. Отсутствие роста по штрихам показывает, что причина изменения цвета или фактуры материала имеет абиогенную природу (рис. 2).

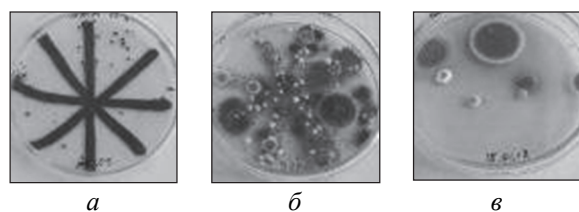


Рис. 2. Результаты посева проб пылевидных налетов на питательные среды:

a – агент плесневого поражения; *б* – основной и сопутствующий агенты плесневого поражения и микобиота пыли; *в* – микобиота пыли

Выделение истинных агентов плесневого поражения непосредственно из материалов требует исключения случайных контаминантов. Образцы пораженных красочных покрытий лучше не брать с горизонтальных поверхностей или мест скопления пыли, а перед рассевом их желательно промыть в стерильной воде.

Довольно сложной задачей является выделение контаминантов из глубины пораженных материалов, где условия обитания, как правило, имеют свою специфику [5]. Так, при микологическом обследовании картона архивных коробок с темными пятнами традиционными методами выявить микроорганизмы, образующие темные пигменты, не удалось. Меланинсинтезирующие грибы были изолированы из картона, лишь когда образцы поместили на среду с экстремально низкой активностью воды, моделируя низкую влажность (рис. 3, а). Положительные результаты дало также создание микроаэрофильных условий, существующих в глубоких слоях. Гриб, обильно выделяющий темный экссудат, вырос на поверхности стерильного образца толстого картона, закрывающего лунку в агаровом геле, куда поместили пробу (рис. 3, б). Для выявления грибов, меланизирующих субстрат, образцы помещали на среды, содержащие предшественники меланинов, например тирозин (рис. 3, в).

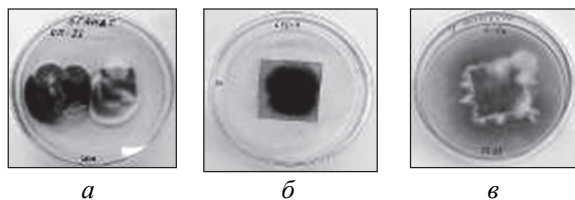


Рис. 3. Результаты выделения агентов плесневого поражения из материалов:

а – микобиота контаминированного картона при выделении в стандартных условиях; б – гриб, выделенный из контаминированного картона в модельных условиях; в – пигментация питательной среды грибом, колонизировавшим картон

В микологическом анализе большое значение имеет определение таксономической принадлежности агентов биоповреждения. Так как определение вида микромицетов-технофилов иногда вызывает трудности даже у опытных микологов из-за морфологических изменений колонизаторов в экстремальных условиях, при идентификации культур желательна фотофиксация основных культурально-морфологических признаков. Это даст возможность уточнить систематическое положение изолята после дополнительных исследований.

Родовая принадлежность гриба *Aspergillus carbonarius*, являющегося основной причиной

пигментации картона, трудностей не вызвала, а видовую удалось определить только после проведения дополнительных исследований. Гриб способен синтезировать афлотоксины, представляющие серьезную опасность для здоровья людей [6]. Сопутствующим контаминантом является *Alternaria alternata*, известная высокой аллергенностью.

Условия, при которых сформировался очаг плесневого поражения, позволяет изучить штаммовые особенности агентов биоповреждения. Информацию для анализа и соответствующих выводов может дать оценка изменения физиолого-биохимической активности грибов под действием факторов внешней среды: влажности, температуры, кислотности и пр.

Основными факторами, влияющим на рост плесневых грибов, является относительная влажность воздуха и активность влаги. Микромицеты-ксерофилы хорошо растут только на субстратах с низким содержанием воды, ксеротолерантные виды способны развиваться в достаточно широком диапазоне активности воды. Культивирование грибов-колонизаторов из разных участков очага плесневого поражения на средах с различным значением активности воды во многих случаях позволяет установить источник увлажнения. Колонии гигрофилов будут находиться непосредственно в месте поступления влаги, по мере удаления от него степень ксеротолерантности будет возрастать.

Активность воды регулируют внесением в среду различных добавок, например хлорида натрия. На средах с 12–20% NaCl способны расти только ксерофильные или ксеротолерантные культуры [3].

Сравнительное изучение ростовой активности меланинсинтезирующих грибов, выделенных из архивных коробок, показало, что *A. carbonarius* характеризуется более высокой ксеротолерантностью, чем *A. alternata*, при этом низкая активность воды стимулирует выделение пигмента, что обуславливает высокую опасность контаминированного картона для сохранности документов даже в условиях нормального режима хранения (табл. 1).

Таблица 1
Радиус колоний (*R*) и ширина зоны пигментации агаризованной среды (*S*) *Aspergillus carbonarius* и *Alternaria alternata*, выделенных из картона, в зависимости от активности воды

Концентрация NaCl, %	<i>A. carbonarius</i>		<i>A. alternata</i>	
	<i>R</i> , мм	<i>S</i> , мм	<i>R</i> , мм	<i>S</i> , мм
0 (a_w 0,99)	12,6	5,1	34,7	0,1
4 (a_w 0,97)	8,4	6,0	27,9	0,4
12 (a_w 0,92)	6,1	10,5	3,8	1,3
16 (a_w 0,86)	3,3	12,4	–	–

В природных условиях мицелиальные грибы развиваются в средах с разными температурными условиями. Каждый вид и даже штамм имеет свои температурные границы, при которых может развиваться, причем активная жизнедеятельность каждого вида возможна в определенных пределах. Микромицеты, растущие при температуре тела человека 37°C, способны вызывать глубокие микозы внутренних органов. Термотолерантные свойства характерны для многих представителей рода *Aspergillus*, в том числе и для штамма *A. carbonarius*, загрязнившего архивные коробки. Присутствие *A. alternata* усиливало выделение *A. carbonarius* меланина, являющегося одним из факторов вирулентности (рис. 4).

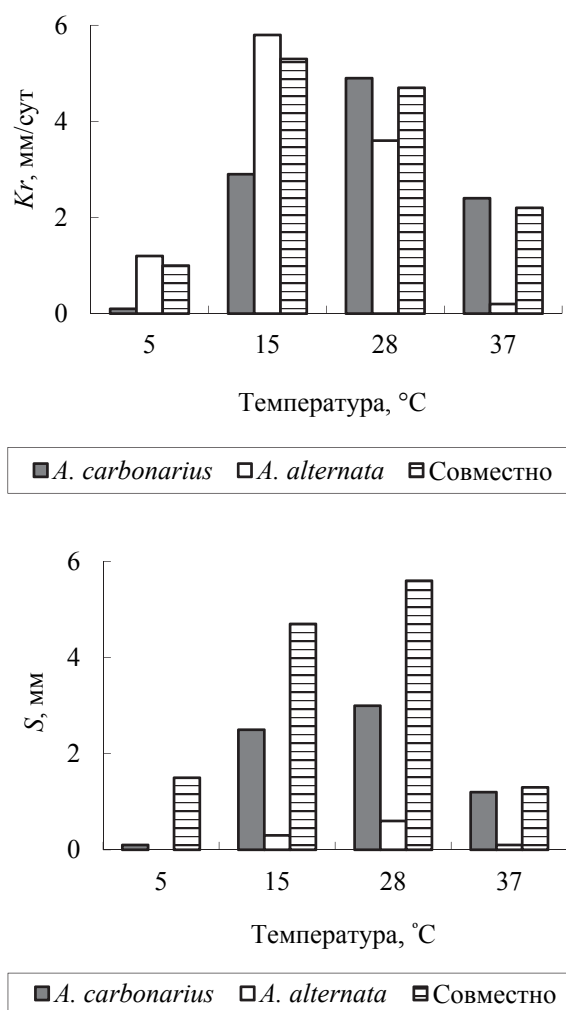


Рис. 4. Радиальная скорость роста (Kr) и ширина зоны пигментации агаризованной среды (S) в зависимости от температуры культивирования *Alternaria alternata* и *Aspergillus carbonarius*, выделенных из картона

В решении проблемы повреждения материалов большое значение имеет оценка характера воздействия агентов биоповреждения на материалы в модельных условиях. Так, для изучения

влияния композиционного состава волокнистой массы на рост и пигментообразование грибов-контаминантов использовали бумагу, при изготовлении которой в лабораторных условиях в качестве волокнистого сырья брали сульфитную беленую целлюлозу, традиционно применяемую на бумажных и картонных предприятиях Беларуси. Для сравнения образцы бумаги также изготавливали с применением целлюлозы сульфатной беленой хвойной, целлюлозы сульфатной из смеси лиственных пород древесины и макулатуры сборной.

Исследование показало, что *Aspergillus carbonarius* хорошо утилизирует различные виды целлюлозы в качестве единственного источника углерода, присутствие макулатуры не оказывает существенного влияния на скорость роста гриба, но значительно усиливает пигментообразование (табл. 2).

Таблица 2
Средний диаметр зоны пигментации образцов бумаги, изготовленных из различных видов целлюлозы и макулатуры, грибом *A. carbonarius*, выделенным из картона

Основа бумаги	Макулатура	Диаметр, мм	
		пятна	колонии
1	–	24,4	16,8
	+	42,5	16,3
2	–	26,1	14,6
	+	38,7	17,0
3	–	28,4	16,2
	+	37,8	16,5
4	+	56,6	16,6

Результаты исследования влагопоглощения полимерных пленок после воздействия плесневых грибов представлены на рис. 5.

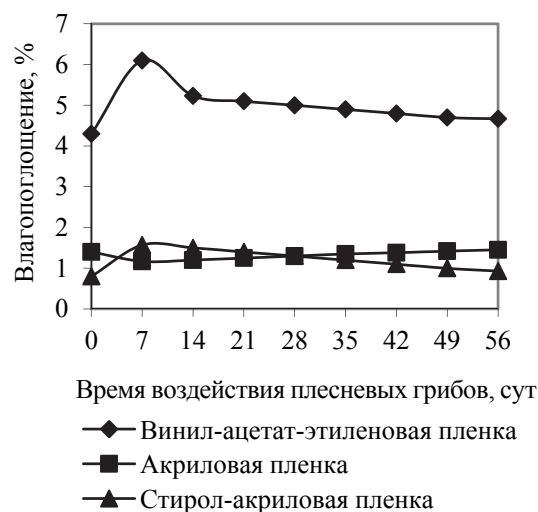


Рис. 5. Изменение влагопоглощения пленкообразователей в зависимости от длительности воздействия плесневых грибов, выделенных из лакокрасочных покрытий

При исследовании воздействия грибов на физико-химические свойства полимерных материалов имитировать массивное плесневое поражение позволяет нанесение на тестируемые образцы микроблоков агаризованной питательной среды (агаровая сетка), инокулированной спорами тест-культур, в качестве которых можно использовать «агрессивные» изоляты [4].

Выявлено, что под действием грибных метаболитов значительно возрастает влагопоглощающая способность винил-ацетат-этиленовых пленкообразователей, особенно значительна она в начальной фазе развития очага плесневого поражения, когда его признаки не всегда заметны (рис. 5). Следствием этого является растрескивание пленочного покрытия и интесификация плесневого процесса.

Всесторонний микологический анализ промышленных материалов, загрязненных плесневыми грибами, позволил установить причины, обусловившие развитие плесневых грибов, оценить нанесенный ими ущерб и опасность для здоровья людей.

Заключение. Проблема защиты промышленных материалов от негативного воздействия микроскопических грибов изучается на протяжении

многих десятилетий, однако и в наши дни она не теряет своей актуальности. Благодаря высокой лабильности ферментативного аппарата микромицеты относительно быстро адаптируются к биоцидным препаратам и другим негативным воздействиям, применение которых без устранения причин развития грибных колоний даст лишь временный эффект. Выяснение условий колонизации материалов плесневыми грибами зачастую имеет решающее значение при разработке мер по ликвидации очагов плесневого поражения и профилактики их появления в дальнейшем. Современные подходы к проведению микологического анализа промышленных материалов, загрязненных микроскопическими грибами, включают несколько этапов: 1 – детальный осмотр и фотофиксация пораженного объекта; 2 – выявление очагов плесневого поражения по высокой степени обсемененности микромицетами и наличия явного видового доминирования; 3 – выделение и идентификация агентов биоповреждения; 4 – изучение штаммовых особенностей агентов биоповреждения по отношению к факторам внешней среды; 5 – оценка характера воздействия агентов биоповреждения на материалы в моделируемых условиях.

Список литературы

1. Проблемы сохранения жилой и производственной инфраструктуры городов от биоразрушения / В. А. Крыленков [и др.] // ИНФСТРОЙ. 2003. № 5. С. 3–13.
2. Антонов В. Б. Микозы и микогенная аллергия как антропогенно-очаговые заболевания // Успехи медицинской микологии: материалы III Всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 24–25 марта, 2005 г. М.: Нац. акад.микологии, 2005. Т. 5. С. 54–56.
3. Ребрикова Н. Л., Понизовская В. Б. Экстремально-ксерофильные грибы, обнаруженные в музейных фондах // Современная микология в России. 2015. Т. 4. С. 298–300.
4. Гончарова И. А. Оценка фунгитоксичности материалов при выборе средств защиты от плесневого поражения // Микология сегодня / под ред. Ю. Т. Дьякова и А. Ю. Сергеева. М.: Нац. акад. микологии, 2011. Т. 2. С. 225–231.
5. Тригубович А. М., Гончарова И. А., Арашкова А. А. Рост микромицетов, выделенных из очагов плесневого поражения архивохранилища, при пониженной температуре и влажности // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. Минск: Беларуская навука, 2019. Т. 11. С. 189–199.
6. Mitchell D., Parra R., Aldred D. Water and Temperature Relations of Growth and Ochratoxin A Production by *Aspergillus Carbonarius* Strains From Grapes in Europe and Israel J Appl Microbiol 2004;97(2):439–445.

References

1. Krilenkov V. A., Vlasov D. Yu., Dashko R. E., Starcev S. A. Problems of preserving the residential and industrial infrastructure of cities from biodegradation *INFSTROY* [INFSTROI], 2003, no. 5, pp. 3–13 (In Russian).
2. Antonov V. B. Mycoses and mycogenic allergies as anthropogenic focal diseases. *Uspekhi meditsinskoy mikologii: materialy III Vserossiyskogo kongressa po meditsinskoy mikologii* [Successes in medical mycology: proceedings of the III All-Russian Congress of Medical Mycology]. Moscow, March 24–25, 2005. Natsional'naya akademiya mikologii, 2005, vol. 5, pp. 54–56 (In Russian).
3. Rebrikova N. L., Ponizovskaya V. B. Extremely xerophilic molds found in museum collections *Sovremennaya mikologiya v Rossii* [Modern Mycology in Russia], 2015, vol. 4, pp. 298–300 (In Russian).
4. Goncharova I. A. Evaluation of the fungitoxicity of materials when choosing means of protection against mold damage Mycology today. *Mikologiya segodnya* [Mycology today]. Moscow, Natsional'naya akademiya mikologii Publ., 2011, vol. 2, pp. 225–231 (In Russian).

5. Trigubovich A. M., Goncharova I. A., Arashkova A. A. The growth of micromycetes isolated from the foci of mold damage of the archive at low temperature and humidity *Mikrobnyye biotekhnologii: fundamental'nyye i prikladnyye aspekty: sb. nauch. tr.* [Microbial Biotechnology: Fundamental and Applied Aspects: Sat. scientific works]. Minsk, Belaruskaya Navuka Publ., 2019, vol. 11, pp. 189–199 (In Russian).

6. Mitchell D., Parra R., Aldred D. Water and Temperature Relations of Growth and Ochratoxin A Production by *Aspergillus Carbonarius* Strains From Grapes in Europe and Israel *J Appl Microbiol* 2004;97(2):439–445.

Информация об авторах

Гончарова Инесса Адамовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела архивоведения. Белорусский научно-исследовательский институт документоведения и архивного дела (220002, г. Минск, ул. Кропоткина, 44, Республика Беларусь). E-mail: gontcharova.mould@gmail.com

Сабадаха Елена Николаевна – кандидат технических наук, доцент кафедры полимерных композиционных материалов. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: elenasabadaha@mail.ru

Тригубович Андрей Михайлович – младший научный сотрудник отдела архивоведения. Белорусский научно-исследовательский институт документоведения и архивного дела (220002, г. Минск, ул. Кропоткина, 44, Республика Беларусь). E-mail: trigubovich777@gmail.com

Черная Наталья Викторовна – доктор технических наук, профессор, профессор кафедры химической переработки древесины. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь).

Information about the authors

Goncharova Inessa Adamovna – PhD (Biology), Leading Researcher, the Department of Archivistics. Belarusian Research Institute of Document Science and Archival Affairs (44, Kropotkina str., 220002, Minsk, Republic of Belarus. E-mail: gontcharova.mould@gmail.com

Sabadakha Elena Nikolaevna – PhD (Engineering), Assistant Professor, the Department of Polymer Composite Materials. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: elenasabadaha@mail.ru.

Trigubovich Andrei Mihailovich – Junior Researcher, the Department of Archivistics. Belarusian Research Institute of Document Science and Archival Affairs (44, Kropotkina str., 220002, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: trigubovich777@gmail.com

Chernaya Natalia Viktorovna – DSc (Engineering), Professor, Professor, the Department of Chemical Processing of Wood. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus)

Поступила 15.06.2020