

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 579.6 : 544.4 : 519.25

РАЗВИТИЕ ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* НА ЛАКОТКАНЕВОЙ ИЗОЛЯЦИИ В РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНО-ВЛАЖНОСТНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2022 г. И. Г. Калинина^{1*}, В. Б. Иванов¹, С. А. Семенов¹, В. В. Казарин¹, О. А. Жданова¹

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова
Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: i_kalinina1950@mail.ru

Поступила в редакцию 11.06.2021;
после доработки 13.07.2021;
принята в печать 20.07.2021

Изучено влияние температурно-влажностных условий на продолжительность периода, предшествующего увеличению массы гриба *Aspergillus niger* при его развитии на лакотканевой изоляции (период адаптации гриба к материалу). Установлено, что определяющее воздействие на его продолжительность оказывает температура. Влияние относительной влажности воздуха незначительно. Предложена простая аналитическая зависимость, описывающая изменение периода адаптации во всем изученном диапазоне температур. Показано, что в интервале температур, наиболее благоприятном для роста микроорганизмов, величина периода связана с температурой зависимостью, аналогичной уравнению Аррениуса. Результаты исследований могут быть использованы при разработке методов оценки и прогнозирования стойкости полимерных материалов к росту на них плесневых грибов в различных климатических условиях.

Ключевые слова: полимерные материалы, микроскопические грибы.

DOI: 10.31857/S0207401X22020042

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что деградация функциональных свойств лакотканевой изоляции (далее — лакоткани) электропроводов при их эксплуатации в составе изделий техники часто связана с развитием на ней плесневых грибов [1]. Наиболее активным и часто встречающимся на лакоткани ее деструктором является грибок *Aspergillus niger* (*A. niger*) [2]. В работах [3–8] проанализированы все три основные стадии процесса повреждения материала грибом: 1) адгезия микроорганизмов, 2) их рост на материале, 3) изменение свойств последнего. Каждую стадию авторы характеризуют набором специфических параметров, которые, как подтверждено экспериментально, чувствительны к природе полимерного материала и виду гриба-деструктора. Это позволило нам предположить, что и первые две стадии, на которых изменение свойств материала еще незаметно, и третья стадия чувствительны также к условиям протекания процесса и, вероятно, могут использоваться для оценки и прогнозирования биодegradации изоляции при ее эксплуатации в различных климатических условиях. Важнейшими из этих условий, с точки зрения взаимодействия микроорганизмов с материалами, являются температура и влажность [9].

Ранее [10] это предположение было подтверждено для начального этапа процесса — адгезионного взаимодействия *A. niger* с лакотканью. Целью данной работы было изучение закономерностей влияния температурно-влажностных условий окружающей среды на параметры роста *A. niger* на лакоткани.

Рост грибов на полимерных материалах изучался, как правило, только при благоприятных для микроорганизмов температурах и влажности. В большинстве работ [2–6, 11–13] его характеризуют величиной массы микроорганизмов (биомассы) на зараженной ими площади. При этом параметрами процесса являются максимальная, достигаемая в эксперименте, величина биомассы, константа скорости ее роста и продолжительность периода, предшествующего началу увеличения массы гриба на зараженном материале, т.е. периода, характеризующего время, необходимое для адаптации гриба к материалу как к источнику питания (далее — период адаптации, *L*). Перечисленные параметры позволяют проводить оценку устойчивости материалов к росту грибов. Чем меньше *L* и выше значения максимальной биомассы и константы скорости ее роста, тем быстрее микроорганизм адаптируется к материалу, интенсивнее протекает его развитие и, следовательно, тем материал менее стоек к росту

на нем плесневого гриба. Указанные параметры взаимосвязаны между собой, поэтому для проведения оценок устойчивости материалов к поражению микроскопическими грибами они могут использоваться совместно или по отдельности. При выполнении рассматриваемых в статье исследований процесс развития *A. niger* на лакоткани характеризовали параметром L , так как экспериментальное определение его значения менее продолжительно и трудоемко, чем других параметров [12, 14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследовали лакоткань, представляющую собой хлопчатобумажную нитяную основу, пропитанную этилцеллюлозным лаком ЭЦ-959 (ТУ-6-10-691-74). Материал испытывали в составе провода БПВЛ (ТУ 16.505.911-76), представляющего собой медную токопроводящую жилу с внутренним слоем изоляции из поливинилхлоридного пластика и наружной лакотканевой оплеткой. В экспериментах использовали образцы провода сечением 10 мм² и длиной 50 мм.

Тест-культурой служил штамм *A. niger* ВКМ F-2039, являющийся активным биодеструктором полимерных материалов, в том числе лакоткани [2–6]. Все работы с грибом (пересев, выращивание, хранение, приготовление суспензии спор, определение ее концентрации, заражение, инкубирование образцов и др.) проводили, используя стандартизованные приемы, методы и режимы [11, 12]. Гриб выращивали на агаризованной среде Чапека–Докса при температуре $(29 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 12 сут. Споры выросшего *A. niger* использовали для приготовления их суспензии в водной среде. Бактериологической петлей их переносили в колбу со средой и тщательно перемешивали. Плотность суспензии составляла $\sim 10^6$ клеток в 1 мл воды. Ее контролировали микроскопически с помощью счетной камеры Горяева.

Суспензию методом распыления наносили на предварительно очищенные от внешних загрязнений образцы. Количество спор гриба на их поверхности составляло $(1 \div 2) \cdot 10^5$. После заражения образцы выдерживали до испарения воды с поверхности в течение 20–40 мин и помещали в камеру тепла и влаги КТВ-0.15 объемом 150 дм³, где поддерживали режимы с различными сочетаниями температуры и влажности. Эксперименты проводили при температурах (t) 15, 20, 24, 28°C и относительной влажности воздуха (ϕ) 75, 85, 98%. При выборе температурно-влажностных условий учитывали, что температура $(29 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительная влажность более 95% являются наиболее благоприятными для развития *A. niger* [11, 12, 14, 15]. Предварительные исследования показали, что дальнейшее повышение температуры приводит к

снижению интенсивности роста микроорганизма. При температуре 15°C и влажности менее 75% признаки роста гриба на лакоткани не обнаруживаются.

Определение продолжительности периода адаптации микроорганизма к материалу проводили, основываясь на методе оценки интенсивности роста грибов на полимерных материалах [11, 12]. Образцы лакоткани извлекали из испытательной камеры и осматривали под микроскопом ($\times 100$), фиксируя внешние признаки развития *A. niger* – появление незначительно развитого мицелия. Осмотры проводили на 4-е сутки инкубации, затем – каждые сутки и через каждые 6–10 ч после появления признаков роста хотя бы на одном образце. При обнаружении на образце указанных внешних признаков его испытания прекращали, а при их отсутствии образец возвращали в камеру тепла и влаги. Величину L принимали равной интервалу времени от начала инкубации зараженного грибом образца до момента обнаружения на нем внешних признаков развития гриба. При каждом сочетании температуры и влажности испытывали пять образцов. Обработку экспериментальных данных проводили по алгоритмам программы STATISTICA 6.1. Разброс результатов не превышал 10%. Его характеризовали отношением среднего квадратического отклонения (R^2) к математическому ожиданию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены полученные методом наименьших квадратов линейные зависимости времени адаптации гриба *A. niger* к лакоткани от влажности воздуха (при различных постоянных значениях температуры). Средние значения L приведены с доверительным интервалом, определенным при уровне значимости $\alpha = 0.05$.

Видно, что в исследованном температурно-влажностном интервале параметр L чувствителен к варьируемым факторам внешней среды. Минимальное его значение, как и следовало ожидать, наблюдается при наиболее благоприятных для гриба условиях: $t = 28^\circ\text{C}$ и $\phi = 98\%$. Снижение температуры до 15°C (при постоянной влажности воздуха) приводит к возрастанию времени адаптации гриба к материалу более чем в четыре раза. Снижение влажности до 75% (при постоянной температуре воздуха) сопровождается незначительным (менее 10%) увеличением величины L . Таким образом, влияние относительной влажности воздуха (при постоянной температуре) на продолжительность адаптации незначительно. Поэтому в качестве обобщающей характеристики периода адаптации гриба к материалу (при данной температуре) можно использовать среднее значение $L_{\text{ср}}$ из полученных при всех исследованных влажно-

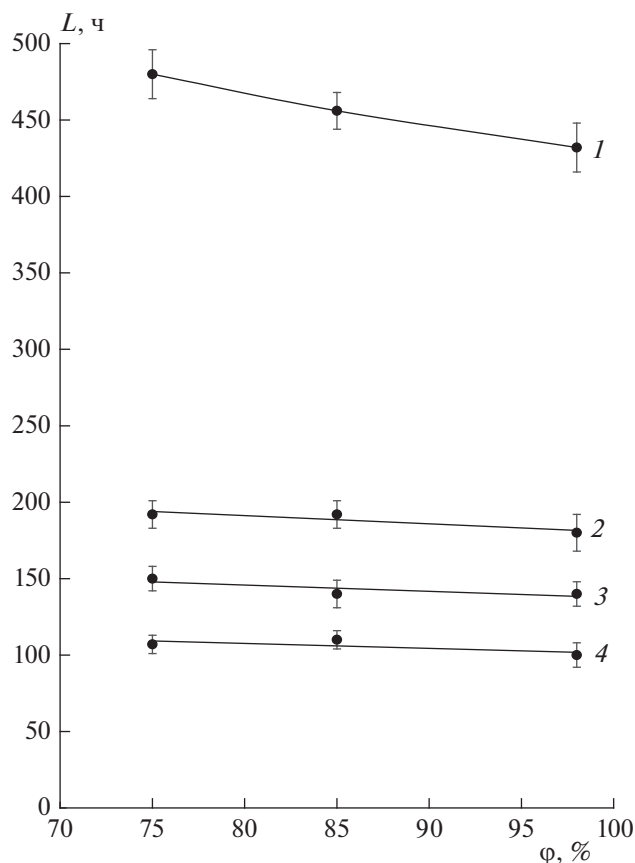


Рис. 1. Зависимость периода адаптации L спор гриба *A. niger* к лакоткани от относительной влажности воздуха ϕ при различных постоянных значениях температуры t : 1 – 15, 2 – 20, 3 – 24, 4 – 28°C. Средние значения L показаны с доверительным интервалом, определенным при уровне значимости $\alpha = 0.05$.

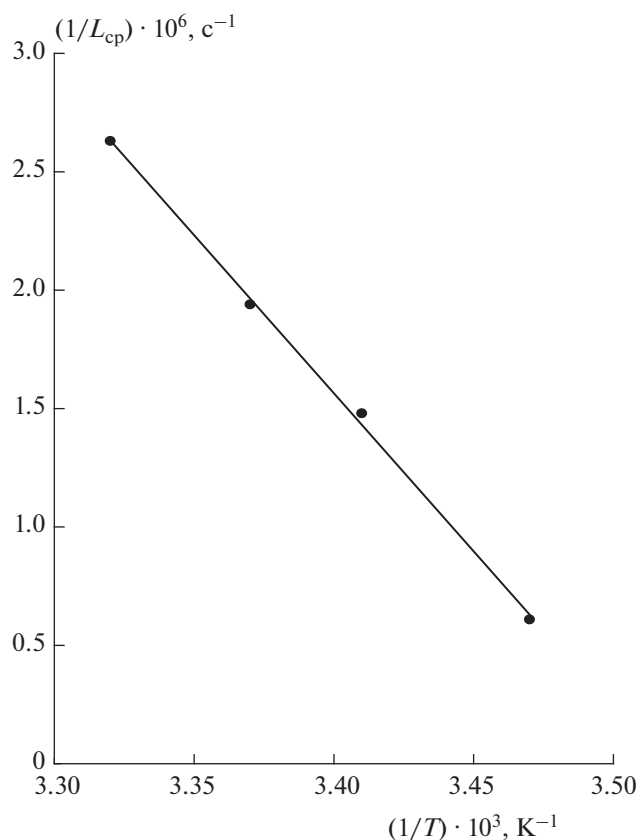


Рис. 2. Зависимость обратной величины периода адаптации $(1/L_{cp})$ спор гриба *A. niger* к лакоткани от температуры. Точки – средние величины при всех значениях относительной влажности при данной температуре (см. текст).

стях. Расчеты показали, что в изученном диапазоне температур зависимость L_{cp} от абсолютной температуры T с высокой точностью ($R^2 = 0.998$) описывается простым эмпирическим законом вида (рис. 2):

$$1/L_{cp} = a - b(1/T), \quad (1)$$

где T – в К, $a = (4.64 \pm 0.22) \cdot 10^{-2}$ в $с^{-1}$ и $b = (1.32 \pm 0.069) \cdot 10^{-2}$ в К/с – коэффициенты, полученные при численном моделировании.

Зависимость $1/L_{cp}$ от $1/T$ в форме уравнения Аррениуса

$$\ln(1/L_{cp}) = \ln A_L - E_L/RT, \quad (2)$$

где E_L – энергия активации процесса адаптации гриба к материалу, A_L – предэкспоненциальный множитель, а R – универсальная газовая постоянная, для тех же экспериментальных точек выполняется заметно хуже ($R^2 = 0.944$). Это объясняется тем обстоятельством, что температура $t = 15^\circ\text{C}$ (288 К) является в определенном смысле “пограничной”, ниже которой адаптация гриба к мате-

риалу не наблюдается. Если данные, полученные при 15°C при анализе средних значений L_{cp} не учитывать, то уравнение (2) выполняется с высокой точностью ($R^2 = 0.999$). Величина энергии активации E_L в этом диапазоне температур составляет (52.1 ± 1.9) кДж/моль, а значение параметра $A_L = (2.81 \pm 0.14) \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$.

Период адаптации гриба к полимерному материалу является в определенном смысле аналогом индукционных периодов термо- [16–19] и фотодеструкции полимеров [20, 21]. Детальный анализ неингибированного термоокисления полимеров [16] свидетельствует о том, что величина индукционного периода определяется кинетическими закономерностями накопления и расходования гидропероксидных групп – основных промежуточных продуктов, ответственных за вырожденно-разветвленный цепной характер процесса. Значения параметров уравнения Аррениуса зависят от химической структуры полимера и составляют (при оценке непосредственно величины индукционного периода) 10^6 – 10^{14} с^{-1} для A и 65–153 кДж/моль для E .

Полученные в данной работе при исследовании начального периода микробиологической деструкции лакоткани значения E_L существенно меньше, а значения A_L больше, чем при термоокислительной деструкции полимеров. Однако необходимо иметь в виду, что для биохимических процессов [22], так же как и для термических [16] наблюдается компенсационный эффект: чем меньше величина E , тем больше A .

Принято считать, что зависимость типа (2) в отличие от эмпирической зависимости (1) имеет определенный физический смысл. Можно полагать, что и в данном случае параметры A_L и E_L в известной степени связаны с химическими и физическими процессами в системе микроскопический гриб – материал.

В частности, авторами монографии [22] при рассмотрении и анализе биохимических процессов обмена веществ в живом организме успешно использовались известные представления о протекании химических реакций. При этом смысл уравнения (2) для рассматриваемого процесса может быть объяснен следующим образом. Известно [15], что скорость процесса развития микроорганизма в период его адаптации к питательному субстрату контролируется специфическими для этого периода биохимическими реакциями синтеза ферментов и других биологически активных веществ, необходимых для последующего роста биомассы. Тогда величина $1/L$ будет характеризовать скорость увеличения содержания в клетках этих веществ, а уравнение (2) – ее зависимость от температуры.

По аналогии с химическими процессами можно полагать, что параметр E_L уравнения (2) характеризует энергетическую, а A_L – пространственную затрудненность процессов, определяющих скорость адаптации микроорганизма к материалу. Отмеченное выше различие параметров E_L и A_L от значений от аналогичных параметров для химических процессов, связано, очевидно, с особенностями биохимических процессов по сравнению с простыми химическими реакциями. Так, например, в работе [22] при исследовании термоинактивации микробных клеток оно объяснялось спецификой разрыва множества (а не единичных) химических связей при термораспаде белковых соединений.

Необходимо отметить, что эмпирический характер выявленных зависимостей ограничивает возможности их применения только для исследованной пары лакоткань – *A. niger*. Вместе с тем общность закономерностей процесса роста плесневых грибов на различных субстратах позволяет предполагать, что рассмотренный подход может быть использован для широкого спектра полимерных материалов и микроорганизмов-биодеструкторов. Кроме того, вероятно, что наряду с

уравнением Аррениуса для анализа исследуемого процесса могут быть использованы и другие закономерности протекания химических реакций, в частности присущие им кинетические уравнения. Целесообразно в дальнейшем оценить возможность и границы их применения для описания роста микроорганизмов-деструкторов на полимерных материалах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При благоприятных для развития грибов температуре (15–28°C) и влажности (75–98%) продолжительность периода, предшествующего увеличению массы плесневого гриба *A. niger* на лакоткани (периода адаптации гриба к материалу) определяется преимущественно температурой и практически не зависит от влажности окружающей среды. Предложена простая аналитическая зависимость, описывающая изменение периода адаптации во всем изученном диапазоне температур. Она позволяет вычислить продолжительность этого периода при любых сочетаниях величин температуры и влажности воздуха в исследованном диапазоне их изменения. Показано, что величина периода адаптации гриба к материалу в интервале температур, наиболее благоприятном для роста микроорганизмов (20–28°C), связана с температурой аналитической зависимостью, аналогичной уравнению Аррениуса. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов оценки и прогнозирования стойкости полимерных материалов к росту на них плесневых грибов в различных климатических условиях.

Работа выполнена в рамках финансирования госзадания ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калинина И.Г., Иванов В.Б., Семенов С.А., Казарин В.В., Жданова О.А. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 11. С. 48.
2. Gumargalieva K.Z., Sevenov S.A., Kalinina I.G., Zaikov G.E., Zimina L.A., Artiss M.I. // RFP (Rubber, Fibre, Plastics) Intern. 2011. V. 6. № 2. P. 114.
3. Калинина И.Г., Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Казарин В.В. // Хим. физика. 2017. Т. 36. № 3. С. 54.
4. Калинина И.Г., Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Казарин В.В. // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 2. С. 78.
5. Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Заиков Г.Е. // Вестн. МИТХТ. 2007. Т. 2. № 6. С. 3.
6. Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Заиков Г.Е. // Вестн. МИТХТ. 2008. Т. 3. № 2. С. 3.
7. Sudip Kumar Sen, Sangeeta Raut // J. Environ. Chem. Eng. 2015. V. 3. P. 4.
8. Whitehead K.A., Deisenroth T., Preuss A., Liauw C.M., Verran J. // Colloids Surf. B. 2011. V. 82. P. 483.
9. Заиков Г.Е., Пехташева Е.Л., Неверов А.Н. Биодеструкция и стабилизация природных и искус-

- ственных полимеров. Основные причины биоповреждений и способы их предотвращения. Saarbrücken, Germany: LAP Lambert Acad. Publ., 2012.
10. Калинина И.Г., Иванов В.Б., Семенов С.А., Казарин В.В., Жданова О.А. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 6. С. 71.
 11. ГОСТ 9.048-89. ЕСЗКС. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М.: Изд-во стандартов, 1994.
 12. ГОСТ 9.049-91. ЕСЗКС. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М.: Изд-во стандартов, 1994.
 13. Vivi V.K., Martins-Franchetti S.M., Attili-Angelis D. // Folia Microbiol. 2019. V. 64. P. 1.
 14. ГОСТ 9.803-88. ЕСЗКС. Фунгициды. Метод определения эффективности.
 15. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987.
 16. Шляпников Ю.А., Кирюшкин С.Г., Марьин А.П. Антиокислительная стабилизация полимеров. М.: Химия, 1986.
 17. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика молекулярного разрушения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1988.
 18. Куценова А.В., Иванов В.Б., Родионова О. Е., Померанцев А.А. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 12. С. 74.
 19. Писаренко Л.М., Касаикина О.Т., Иванов В.Б. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 9. С. 31.
 20. Zhuravlev M.A., Ivanov V.B. // Eur. Polym. J. 1989. V. 25. P. 391.
 21. Ivanov V.B., Bitt V.V., Solina E.V., Samoryadov A.V. // Polymers. 2019. V. 11. № 10. 1579.
 22. Мунблит В.Я., Тальрозе В.Л., Трофимов В.И. Термоинaktivация микроорганизмов. М.: Наука, 1985.