

Биолог. журн. Армении, 1-2 (56), 2004

УДК 579.6:620.193.8

ОБ АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВАХ ГРИБОВ-БИОДЕГРАДАНТОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Л.Г. АНТОНЯН, В.Б. ГОГИНЯН, Н.Л. КАЗАНЧЯН, Э.К. АФРИКЯН

*Республиканский Центр Депонирования Микробов НАН Армении, 378510,
г. Абовян, microbio@sci.am*

Изучена адгезия к поверхности полимерных пленок спор различных видов грибов, выделенных из биоповрежденной космической техники. С применением оригинальной методики показано, что адгезивные свойства спор изученных видов грибов имеют штаммовые отличия и в определенной степени приурочены к отдельным видам. С использованием культуры активного биодеграданта *Penicillium aurantiogriseum* исследованы особенности процесса адгезии спор к поверхности лавсана (полиэтилентерефталат).

Ուսումնասիրվել են կենսաքայքայված տիեզերական տեխնիկայից անջատված տարբեր տեսակի սնկերի սպորների ադիզիվ հատկությունները բաղաձայնի մակերևույթին: Յուրօրինակ մեթոդիկայի կիրառմամբ ցույց է տրվել, որ սնկերի ուսումնասիրված տեսակների ադիզիվ հատկությունները ունեն որոշակի տեսակային և շտամային պատկանելիություն: Օգտագործելով ակտիվ կենսաքայքայիչ *Penicillium aurantiogriseum*-ի կուլտուրան ուսումնասիրվել են սպորների ադիզիվ երևույթը լավսանի (պոլիէթիլէնտերեֆտալատ) մակերևույթին:

Adhesion of spores of different species of fungi isolated from biodegraded space technique to the surface of polymeric films has been studied. Using an original methodology it was revealed that adhesive properties have species specificity with strains deviations. By application of active biodegradant culture of *Penicillium aurantiogriseum* the patterns of adhesion phenomena have been investigated to dacron (polyethylene terephthalate) films.

Грибы-биодеграданты - адгезия — полимерные материалы

Способность микробных клеток прилипать к различным поверхностям (адгезионная способность) представляет большой интерес для решения широкого круга вопросов инфекционной патологии, биодеградации различных материалов и микробных ценозов в природе. В физическом плане существенный интерес представляют работы по определению силы адгезии частиц (клеток) путем фиксации их с последующим отрывом под действием центробежной силы инерции и вычислением силы адгезии по числу отделившихся частиц (клеток) [2, 3].

Адгезия микробных клеток является начальной стадией биообрастания материалов, однако общепринятыми методами невозможно рассматривать этот процесс в комплексном подходе для оценки микробного биоповреждения и биоразрушения полимерных материалов. Целевой установкой этих работ должна явиться разработка научно-технических предложений и рекомендаций

по направленному созданию синтетических полимерных материалов и других органических соединений с заданными свойствами на микробиологическую стойкость. Условия эксплуатации неметаллических материалов в герметически замкнутых системах, в частности обитаемых космических аппаратах, требуют предотвращения обрастания неметаллических материалов микроорганизмами, которые могут служить источником различных инфекций.

Процессы микробного обрастания и разрушения синтетических полимеров имеют определенные закономерности и общие особенности.

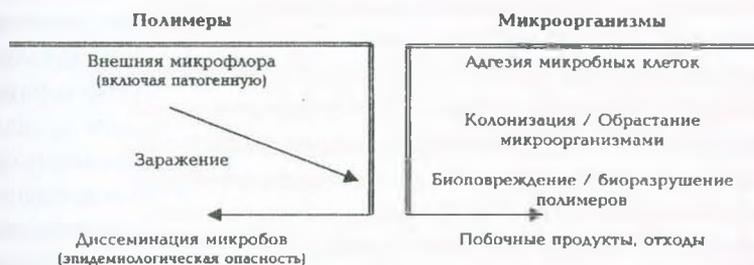


Рис. 1. Основные стадии микробных повреждений и разрушений материалов из синтетических полимеров.

На рис. 1 схематично представлены основные этапы развития процесса микробного повреждения полимерных материалов: адгезия клеток, рост и колонизация, образование различных метаболитов, таких как ферменты, органические кислоты и другие продукты микробного метаболизма.

Ведущей группой микроорганизмов, участвующих в процессах обрастания и биоповреждений материалов, являются микроскопические грибы, причем внутри отдельных родов и видов грибов обнаруживается большая вариабельность, что проявляется как их сильной агрессивностью, так и полным отсутствием ее [1, 4].

В настоящее время опубликованы крайне ограниченные сведения, касающиеся микробиологических повреждений материалов, применяемых в космической технике, несмотря на исключительную важность данной проблемы для жизнеобеспечения космических полетов.

Наша работа посвящена изучению адгезии спор грибов, выделенных из космической техники, к поверхности полимерных пленок.

Материал и методика. Объектами исследований служили водные суспензии спор грибов-биодegradантов, выращенных на агаризованных средах Чапека и Сабуро (инкубация 14 сут., 28°): *Aspergillus ustus* 8268*, *A. fumigatus* 12036, *A. niger* 8133, *A. puniceus* 8287, *A. terreus* 8114, *Cladosporium herbarum* 8270, *Paecilomyces variotii* 8135, *Penicillium aurantiogriseum* 8119, *P. aurantiogriseum* 12040, *P. chrysogenum* 8128, *P. funiculosum* 8120, *P. melinii* 12035, *P. melinii* 12038, *P. chrysogenum* 12039, *Scopulariopsis brevicaulis* 8272, *Trichoderma viride* 8125, *Ulocladium botrytis* 12037.

На поверхность пленок полимеров (фторопласты, полиамиды, полиимиды и др.), закрепленных на вращающемся алюминиевом диске диаметром 10 см, наносили суспензию спор микромицетов (титр 100 тыс. КОЕ/мл) в объеме 1,0 мл. Далее, после последовательных вращений с угловой скоростью 500 и 3000 об/мин в течение 2 мин и одноминутной фазой покоя между ними, проводили исходные отпечатки. Затем, последовательно

* Номера штаммов указаны по Коллекции культур Республканского Центра Делонирования Микробов.

проводили смывы стерильной водой и 1%-ным раствором твина 60, и после вращения диска с угловой скоростью 3000 об/мин проводили новые последовательные отпечатки на чашки Петри с предварительно разлитой средой Чапека. Чашки инкубировали в термостате при 28° в течение 5-7 сут. Учет числа колоний проводили с помощью трафарета, подкладываемого под чашку Петри. Число выращенных колоний учитывали по формуле, на единицу площади радиальной поверхности чашки:

$$S_k = N_k / (R_k - R_{k-1})^2,$$

где S_k - число колоний на единицу площади; N_k - количество радиально расположенных колоний; R_k и R_{k-1} - радиусы.

Результаты и обсуждение. Нами испытаны различные методы исследования адгезии микроорганизмов на поверхности синтетических материалов с использованием установки с прокачиванием культуральной жидкости между двумя параллельными дисками исследуемого материала и установки с вращающимся экспериментальным диском с заданными выходными параметрами. С использованием созданных установок исследована кинетика адгезии микробов при различных угловых скоростях вращения диска.

На основе сравнительного изучения выбран метод исследования адгезии клеток микробов с определением радиального распределения микроорганизмов на поверхности вращающегося в плоскости диска с пленкой полимерного материала. Результаты опыта позволили установить из изученных культур наиболее активные по адгезивным свойствам штаммы, что видно из выборочных данных, представленных в таблице.

Таблица. Адгезивные свойства некоторых штаммов грибов-биодегрантов (средние данные 3-х повторностей)

| Культуры грибов-биодегрантов | Число колоний на единицу площади радиальной зоны R_n чашки Петри | | | | | | | | |
|---|--|--------|--------|--|------|--------|---|------|------|
| | Исходный отпечаток | | | Отпечаток после смыва стерильной водой | | | Отпечаток после смыва 0,5%-ным раствором твина 60 | | |
| | R1 | R3 | R5 | R1 | R3 | R5 | R1 | R3 | R5 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> 12036 | 1,0 | 10,8 | Сп. р. | 0 | 4,8 | Сп. р. | 0 | 1,1 | 11,3 |
| <i>A. niger</i> 8133 | 0 | 0,3 | 1,8 | Н.д. | Н.д. | Н.д. | Н.д. | Н.д. | Н.д. |
| <i>A. puniceus</i> 8287 | 40,0 | 32,0 | Сп. р. | 1,0 | 0,8 | 1,5 | 2,0 | 0,2 | 0,5 |
| <i>A. terreus</i> 8114 | Сп. р. | Сп. р. | Сп. р. | 20,0 | 16,0 | 15,0 | 11,0 | 14,0 | 0 |
| <i>A. ustus</i> 8268 | 10,0 | 48,0 | 35,0 | 10,0 | 6,0 | 0 | 0 | 0,2 | 0 |
| <i>Cladosporium herbarum</i> 8270 | 60,0 | 24,0 | 20,0 | 5,0 | 2,0 | 7,3 | 0 | 0 | 1,3 |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> 8119 | 120,0 | 36,0 | 0 | 1,0 | 3 | 0 | 0 | 3,6 | 5,5 |
| "-" 12040 | Сп. р. | Сп. р. | Сп. р. | 1,0 | 8,4 | 3,3 | 0 | 2,8 | 2,1 |
| <i>P. chrysogenum</i> 8128 | 20,0 | 14,0 | 17,0 | 0 | 1,4 | 3,5 | 0 | 0,2 | 2,2 |
| <i>P. funiculosum</i> 8120 | 60,0 | 48,0 | Сп. р. | 1,0 | 2,2 | 13,3 | 1,0 | 1,2 | 1,7 |
| <i>P. chrysogenum</i> 12039 | 1,0 | 3,6 | 7,1 | 0 | 3,0 | 2,6 | 1,0 | 0,4 | 1,1 |
| <i>P. melinii</i> 12035 | 120,0 | 32,0 | 40,0 | 16,0 | 9,6 | 10,7 | 20,0 | 16,0 | 8,0 |
| "-" 12038 | 50,0 | 42,0 | 44,0 | 3,0 | 0,8 | 8,0 | 1,0 | 0 | 10,7 |
| <i>Paecilomyces variotii</i> 8135 | 30,0 | 16,0 | 11,0 | 0 | 0,4 | 1,4 | 0 | 0,2 | 0 |
| <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> 8272 | Сп. р. | Сп. р. | Сп. р. | 10,0 | 1,6 | 0,9 | 1,0 | 0 | 3,3 |
| <i>Trichoderma viride</i> 8125 | Сп. р. | Сп. р. | Сп. р. | 0 | 17,6 | 24,8 | 0 | 10,0 | 0 |
| <i>Ulocladium botrytis</i> 12037 | 1,0 | 1,2 | Сп. р. | 0 | 0 | 1,3 | 0 | 0 | 0 |

Условные сокращения: Сп. р. - сплошной рост, Н.д. - нет данных.

Равномерное распределение колоний на поверхности питательной среды после отпечатков наблюдалось при $\omega=500$ об/мин. Наиболее оптимальным является объем суспензии 1 мл при титре 100 тыс. КОЕ/мл. Адгезивные свойства исследованных микромицетов, согласно полученным данным, являются видоспецифичными. Так, например, штамм *A. niger* 8133, имея сходные структуру и размеры конидий с *A. ustus* 8268, в отличие от второго, высокими адгезивными свойствами не обладал. В другом случае, вид *C. herbarum* 8270 с гладкостенными конидиями обладал высокими адгезивными свойствами.

Серия специальных исследований, проведенных для установления наличия взаимоотношений между размерами и поверхностью спор с их адгезивностью, не позволила установить существование определенной закономерности между ними.

Исследованиями обнаружено, что высокой адгезивностью характеризуются споры следующих видов: *P. aurantiogriseum* (*cyclopium*) 8119, *P. aurantiogriseum* 12040, *P. chrysogenum* 8128, *P. funiculosum* 8120, *P. melinii* 12035, *P. melinii* 12038, *P. variotii* 8135, *T. viride* 8125, *A. terreus* 8114; *A. puniceus* 8287, *A. ustus* 8268, *C. herbarum* 8270, *S. brevicaulis* 8272.

В процессе изучения явления адгезии микроорганизмов на поверхности полимерных материалов исследована зависимость процесса обрастания от угловых скоростей вращения диска с использованием смыва суспензии грибов водой и детергентами (твин, желчь).

Одним из наиболее активных штаммов грибов-биодegradантов являются споры *P. aurantiogriseum* 8119, который был более подробно изучен с применением различных детергентов по схеме, представленной на рис. 2.

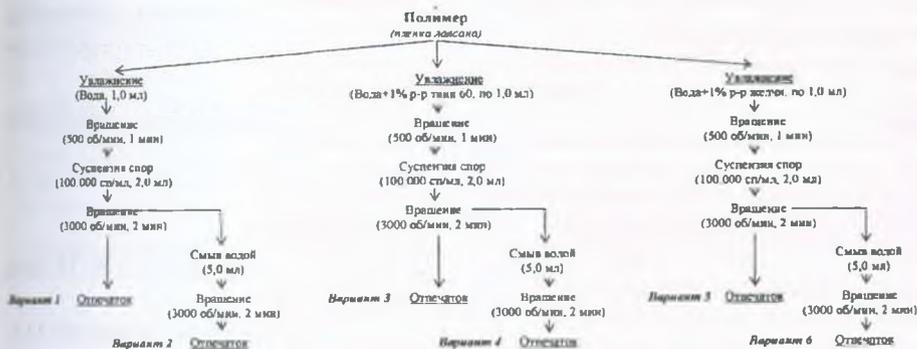


Рис.2. Схема вариантов опыта изучения адгезивных свойств *Penicillium aurantiogriseum* 8119

На рис. 3 представлено графическое изображение зависимости адгезивных свойств спор *P. aurantiogriseum* 8119 к лавсану от детергентов, которыми обрабатывали поверхность полимера.

Видно, что при увлажнении материала водой с последующим нанесением суспензии спор микромицета и отпечатками происходит относительно равномерное распределение количества колоний по всей поверхности питательной среды, что указывает на высокую адгезивную активность микроорганизма даже при достаточно высокой угловой скорости

вращения диска с полимером. Отпечатки спор более отчетливо видны на ближних к центру радиальных поверхностях материала. Однако при нанесении детергентов, таких как 1%-ные растворы твина 60 и желчи, сила сцепления микроба с поверхностью материала резко уменьшается. Отпечатки испытуемого материала показали, что споры распределяются на средних и дальних радиальных поверхностях полимера как при низких, так и при высоких угловых скоростях, причем надо отметить и тот факт, что споры культуры полностью не смываются с поверхности лавсана.



Рис. 3. Адгезивные свойства *Penicillium aurantiogriseum* 8119 к лавсану (варианты по схеме рис.2).

Таким образом, сравнительные испытания с использованием штаммов различных видов грибов с биоповреждающей активностью к полимерам позволили сделать заключение о наличии определенной видовой специфики испытанных грибов в явлении микробной адгезии. Полученные данные использованы для разработки математических формул для интерпретации адгезии микробных клеток.

Авторы выражают признательность С.А. Геворкян и Н.С. Хачатурян за идентификацию предоставленных культур грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микробное повреждение материалов. Сб. под ред. Африкяна Э.К. Изд-во Академии наук Арм. ССР, Ереван, 180 с, 1985.
2. Трусков В.М. Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, 3, 111-114, 1982.
3. Microbial Adhesion to Surfaces. Berkeley R.C. W. et al., eds. E. Horwood Ltd, London., Chichester Publishers. 560 pp, 1980.
4. Zita A., Hermansson M. FEMS Microbiology Letters, 152, 2, 299-306, 1997.

Поступила 02.IV.2004