

**Шабан Ж. Г.**

*Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск*

**Давыдов А. А.**

*Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск*

**Скавинская А. Е.**

*Белорусский государственный медицинский университет,  
г. Минск*

**Гончарова И. А.**

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,  
г. Минск, Беларусь*

## **ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ASPERGILLUS NIGER В ПОРАЖЕНИИ СТРОИТЕЛЬНЫХ КОНСТРУКЦИЙ И ПРИЧИН ЕГО УСТОЙЧИВОСТИ К МЕДЬСОДЕРЖАЩИМ ФУНГИЦИДАМ**

В последнее время возросло число случаев грибковой контаминации жилых помещений. В условиях повышенной влажности помещений микромицеты колонизируют строительные материалы, вызывая их функциональную деградацию. Длительное пребывание людей в помещениях, контаминированных микромицетами, ведёт к колонизации ими дыхательных путей, вызывает сенсibilизацию и ведёт к развитию аллергических реакций.

Актуальность проблемы также обусловлена низкой эффективностью мероприятий по грибковой деконтаминации жилых помещений. Несмотря на разнообразие фунгицидов, выбор эффективного средства является довольно сложной задачей из-за высокой устойчивости микромицетов к ним. При этом фунгицидные композиции часто не только не обеспечивают ликвидацию очагов грибного поражения, а иногда даже усугубляют ситуацию.

**Цель работы** — изучить влияние сульфата меди, как основного действующего вещества многих фунгицидов, на рост и развитие микромицетов.

**Материалы и методы.** Из очагов плесневого поражения в жилых помещениях путём культивирования на агаризованной среде Чапека выделено 36 штаммов микроскопических мицелиальных грибов.

Выделенные штаммы *Aspergillus niger* культивировали в жидкой среде Чапека–Докса с различными концентрациями сульфата меди. Посевным материалом служила суспензия спор 10-суточной поверхностной культуры или пеллеты 3-суточной глубинной культуры. Измеряли параметры роста микромицетов, оценивали степень пигментации, измеряли кислотность среды.

Сорбцию ионов меди оценивали методом комплексометрического титрования 0,1 н раствором Na<sub>2</sub>ЭДТА в присутствии индикатора мурексида.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 7.0.

**Результаты и обсуждение.** Выделение грибов из мест плесневого поражения строительных материалов. Микологическое обследование жилых помещений показало, что в большинстве проб доминировала одна культура. При этом в 40 % проб доминировали грибы рода *Aspergillus*. В 32 % проб присутствовали грибы рода *Penicillium*, в 15 % проб — темноокрашенные грибы родов *Alternaria*, *Botrytis* и *Cladosporium*, в 3 % — *Chaetomium* и *Rhizopus*. Гриб *A. niger* наиболее активно развивался на строительных материалах, ранее обработанных медным купоросом.

Влияние сульфата меди на рост и развитие микромицетов, выделенных из очагов плесневого поражения. Для борьбы с плесневым поражением строительных материалов до настоящего времени широко используются фунгициды, содержащие сульфат меди, несмотря на то, что после подобной обработки нередко наблюдаются случаи повторной колонизации грибами, отличающихся высокой спорообразующей и повреждающей способностью.

С целью изучения причин данного явления было исследовано действие ионов меди на рост грибов, выделенных из очагов плесневого поражения. Установлено, что 0,01 % сульфат меди, высокотоксичный для большинства коллекционных культур микроскопических грибов, полностью ингибировал рост лишь двух штаммов, выделенных из мест плесневого поражения. У 8 штаммов наблюдалась стимуляция роста глубинного мицелия в присутствии 0,0005 % сульфата меди. Наиболее высокий выход биомассы на среде с высоким содержанием ионов меди отмечен у *A. niger*. Данный гриб был выбран в качестве модельной культуры для более детального изучения влияния медного купороса на жизнедеятельность плесневых грибов.

Влияние сульфата меди на рост и развитие гриба *Aspergillus niger*. С целью изучения влияния посевного материала на чувствительность грибов к токсическому действию сульфата меди в качестве инокулюма использовали как споры, так и вегетативный мицелий *A. niger*.

При посеве спорами концентрационнозависимое торможение роста *A. niger* наблюдалось в первые трое суток культивирования при всех исследованных концентрациях сульфата меди, затем происходила интенсификация радиального роста колоний. Полное ингибирование роста наблюдалось при 0,075 % концентрации сульфата меди.

Инокуляция среды пеллетами ослабляла эффект зависимости лаг-фазы от содержания ионов меди. Стимуляция роста низкими концентрациями фунгицида (0,001–0,0075 %) проявлялась уже на вторые сутки инкубации. Способность гриба к активному росту, несмотря на длительный лаг-период, наблюдалась даже при внесении в среду 0,1 % сульфата меди (табл. 1).

Таблица 1

Рост колоний *A. niger* на агаризованной среде Чапека с различным содержанием сульфата меди при посеве пеллетами

Концентрация сульфата меди, %	Среднее значение радиуса колоний, мм						
	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	6 сут	14 сут	21 сут
0	13,7	20,2	33,4	40,3	45,0	45,0	45,0
0,0010	14,1	20,7	33,9	40,8	45,0	45,0	45,0

0,0050	15,3	25,1	32,7	41,5	45,0	45,0	45,0
0,0075	14,8	23,3	31,9	40,0	44,6	45,0	45,0
0,010	13,4	21,6	28,5	36,8	42,6	45,0	45,0
0,025	5,8	15,7	21,4	28,3	32,7	45,0	45,0
0,050	0	0,5	2,2	5,1	10,5	41,6	45,0
0,075	0	0	0	2,7	5,0	27,5	43,8
0,100	0	0	0	0	0	22,8	40,2

В условиях глубинного культивирования при посеве спорами стимулирующий эффект сульфата меди не проявлялся, тогда как при посеве пеллетами на среде с 0,001–0,005 %  $\text{CuSO}_4$  выход биомассы был выше, чем в контроле (табл. 2).

Пеллеты гриба, сформированные при прорастании спор, имели различное строение в зависимости от концентрации фунгицида. В контроле пеллеты были гладкие и пустотелые, в присутствии ионов меди — ворсистые, с компактным центром и более рыхлым наружным слоем. При увеличении концентрации сульфата меди средний диаметр пеллет возрастал. В присутствии высоких концентраций сульфата меди пеллеты не формировались, а биомасса состояла из бесформенных гифальных скоплений.

Таблица 2

**Рост и пигментация *A. niger* в жидкой среде Чапека–Докса с различным содержанием сульфата меди при посеве спорами или пеллетами**

Концентрация $\text{CuSO}_4$ , %	Конечный pH		Биомасса, г/л		Пигментация	
	споры	пеллеты	споры	пеллеты	споры	пеллеты
0	2,6	2,5	7,5	7,1	–	±
0,0010	2,6	2,5	6,8	7,6	±	++
0,0025	2,6	2,4	5,9	8,0	+	++
0,0050	2,6	2,6	5,4	7,4	++	+++
0,0075	4,5	3,8	3,7	6,2	+++	+
0,0100	4,7	3,9	0,1	1,9	+++	+

На среде с низким содержанием ионов меди центральная область пеллет приобретала чёрно-коричневую окраску с чётко выраженной концентрической зональностью, рыхлая периферическая часть пеллет оставалась неокрашенной. С увеличением концентрации меди в среде внутренняя тёмноокрашенная область пеллеты расширялась и пигмент накапливался на её внешней стороне.

При посеве спорами средний диаметр пеллет увеличивался по мере повышения концентрации сульфата меди до 0,01 %. В вариантах инокуляции питательной среды глубинным мицелием в присутствии относительно низких концентраций фунгицида (0,001–0,005 %) средний диаметр пеллет был выше, чем в контроле, при более высоких — ниже (рис. 1).

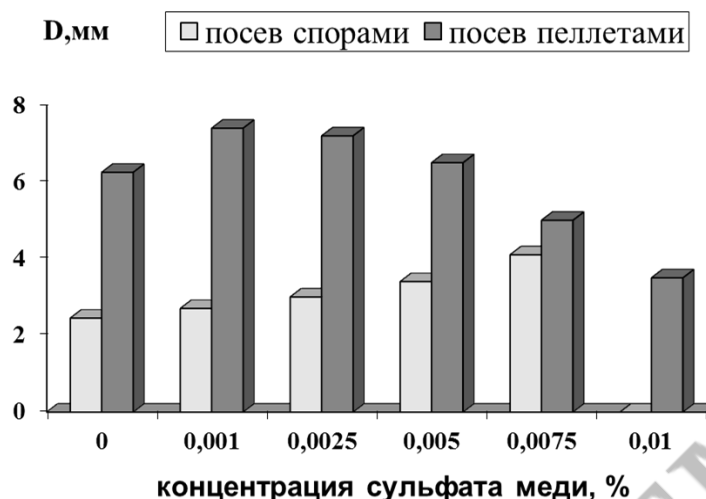


Рис. 1. Средний диаметр пеллет *A. niger* через 7 сут культивирования в жидкой среде Чапека–Докса с разным содержанием сульфата меди при посеве спорами и пеллетами

Синтез чёрно-коричневых пигментов меланинов — одна из основных адаптивных неспецифических реакций микромицетов, обеспечивающих устойчивость грибных клеток при возникновении неблагоприятных условий. Преимущественное развитие меланизированных культур в значительной мере связано с высокой способностью меланина связывать ионы металлов. По сорбционным свойствам выявлены заметные различия между тёмнопигментированными штаммами и атипичными мутантами тех же видов.

Значительное влияние на процессы извлечения ионов тяжёлых металлов из растворов оказывает кислотность среды. В щелочных или нейтральных растворах большинство металлов выпадает в осадок. По мере приближения кислотности растворов к нейтральной эффективность сорбции тяжёлых металлов меланином и тёмноокрашенной грибной биомассой возрастает.

Гриб *A. niger* в процессе роста на среде с относительно низким содержанием ионов меди значительно подкислял питательную среду, снижая её pH с 6,0 до 2,4–2,6. Сравнительная оценка сорбционной способности по отношению к ионам меди непигментированной и тёмноокрашенной биомассы гриба при различных значениях pH показала, что в диапазоне высокой кислотности среды непигментированная биомасса связывает медь более активно, чем меланинсодержащая. При pH выше 3,5 данный параметр у пигментированного мицелия был выше, чем в контроле (рис. 2).

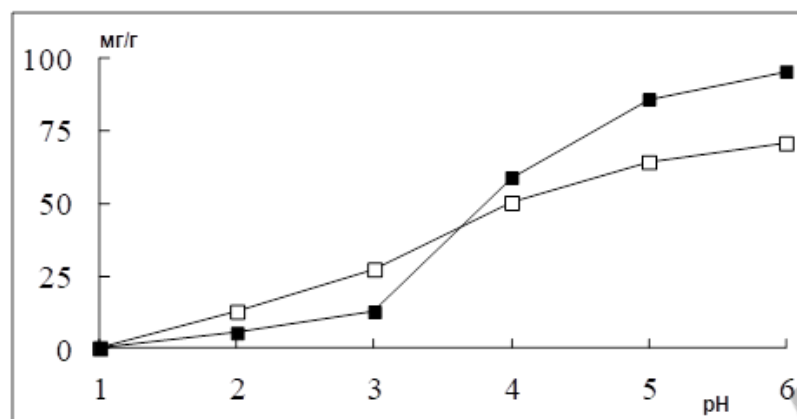


Рис. 2. Сорбционная ёмкость по отношению к ионам меди светлой (□) и меланинсодержащей (■) биомассы *A. niger* в зависимости от pH раствора сульфата меди

В присутствии высоких концентраций сульфата меди в среде, когда кислотность среды повышается незначительно, сорбция ионов меди биополимерами клеточной стенки, в первую очередь меланинами, может играть значительную роль в снижении токсичности среды и повышении устойчивости гриба.

Выявленные особенности поведения *A. niger* в присутствии сульфата меди объясняют причину частой устойчивости грибов к фунгицидам. Полученные сведения следует использовать для эффективного устранения грибковой контаминации помещений, разрабатывая рациональные комбинации действующих веществ в фунгицидных композициях.

#### **Выводы:**

1. При микологическом обследовании строительных конструкций жилых помещений с признаками плесневого поражения установлена доминирующая роль грибов рода *Aspergillus*.

2. Для большинства выделенных штаммов *A. niger* характерна устойчивость к медному купоросу. Большая устойчивость наблюдается при использовании в качестве посевного материала вегетативного мицелия, чем при засеве питательной среды спорами. Низкие (0,001–0,005 %) концентрации  $\text{CuSO}_4$  стимулируют рост *A. niger*.

3. Ионы меди стимулируют синтез меланина. Высокая сорбционная активность меланина по отношению к тяжёлым металлам способствует интенсивному связыванию ионов меди грибной биомассой, что снижает концентрацию фунгицида в среде, стимулирует рост мицелия и усиливает повреждающую способность гриба.

4. Концентрации фунгицидов, высокотоксичные для большинства коллекционных культур микроскопических грибов, часто не ингибируют рост штаммов *A. niger*, выделенных из мест плесневого поражения. Поэтому для полноты грибковой деконтаминации необходимо предварительное тестирование эффективности фунгицидных составов в отношении штаммов, выделенных из мест плесневого поражения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин, И. И. Влияние экологического неблагополучия на распространённость болезней органов дыхания / И. И. Балаболкин // Проблемы медицинской микологии. 2009. № 17. С. 16–19.
2. Богомолова, Т. С. Микобиота некоторых жилых помещений в г. Санкт-Петербурге и Ленинградской области / Т. С. Богомолова, Н. В. Васильева, Г. И. Горшкова // Проблемы медицинской микологии. 1999. Т. 1, № 3. С. 41–43.
3. Марфенина, О. Е. Экологические условия развития потенциально патогенных мицелиальных грибов / О. Е. Марфенина, Г. М. Фомичева, А. Б. Кулько // Успехи медицинской микологии. 2005. Т. 5. С. 74–77.
4. Скавинская, А. Е. Роль микроскопических мицелиальных грибов в «синдроме больного здания» / А. Е. Скавинская, А. А. Давыдов // Актуальные проблемы современной медицины 2011 : материалы 65-й Междунар. науч. конф. студентов и молодых учёных. Минск : БГМУ, 2011. Ч. 2. С. 444–446.
5. *Microbial growth inside insulated external walls as an indoor air biocontamination source* / A. M. Pessi [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. 2002. Vol. 68, № 2. P. 963–967.

Репозиторий БГМУ