

УДК 579.66:[620.193.8+504.054]

**ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ИЗЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ
ИМПУЛЬСНОГО ИСКРОВОГО РАЗРЯДА НА ЗАРОДЫШЕВЫЕ СТРУКТУРЫ
И МИЦЕЛИЙ МИКРОМИЦЕТОВ-ДЕСТРУКТОРОВ**© 2011 г. *А.А. Ичеткина, С.В. Трофимова, Д.В. Кряжев, И.П. Иванова, В.Ф. Смирнов*

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

fungo.cem@gmail.com

Поступила в редакцию 02.06.2011

Исследовано влияние ультрафиолетового и некогерентного импульсного излучения на мицелий и зародышевые структуры ряда микромицетов. Показано, что спороцидное действие некогерентного импульсного излучения сопоставимо с действием ультрафиолетового излучения. Вегетативный мицелий исследованных тест-культур оказался не чувствительным к действию данных излучений. Установлено, что трехкратное воздействие ультрафиолетового излучения не оказывает ингибирующего действия на зародышевые структуры микромицетов, а воздействие некогерентного импульсного излучения полностью ингибирует их жизнеспособность.

Ключевые слова: биоповреждения, микромицеты, споры, мицелий, ультрафиолет, электрический разряд, дезинфекция, физические методы стерилизации.

Введение

Биоповреждение материалов различного химического состава является актуальной экологической проблемой, к которой в последние годы приковано внимание исследователей в различных странах. Деструкцию памятников архитектуры, искусства, жилых и общественных зданий вызывают не только химические и физические факторы, ускоряющие процесс естественного старения материалов, но и различные микроорганизмы. Наиболее активными агентами биоповреждений являются мицелиальные грибы и бактерии. В последние годы наблюдается резкое увеличение численности микромицетов на антропогенных субстратах и повышение их роли в деструкционных процессах. В качестве источника питания микроскопические грибы могут использовать вещества, входящие в состав строительных и различных отделочных материалов, а также органику, присутствующую в пылевых осаждениях. Грибы разрушают или изменяют структуру материалов, приводят к снижению прочности элементов конструкций и, в конечном итоге, к преждевременному старению и разрушению конструктивных элементов или целых зданий.

Кроме этого, проблема биоповреждений тесно связана с экологией человека, так как многие деструкторы различных материалов являются условно патогенными микроорганизмами, способными вызывать серьезные заболевания человека. В сыром жилье, пораженном

микромицетами, люди наиболее подвержены респираторным заболеваниям, таким как ринит, охриплость, синусит. У жильцов ряда других зараженных микромицетами домов зафиксированы частые явления астмы, нейродермита, раздражения слизистой оболочки рта и носа. В качестве возможных механизмов поражения рассматриваются аллергические, раздражающие, токсические эффекты с участием спор, летучих метаболитов или микотоксинов плесневых грибов [1].

Активизация деятельности технофильных видов грибов способствует увеличению инфекционной нагрузки в результате освоения новых территорий, а также возникновению особенно агрессивных популяций грибов с высокой степенью эврибиотности. Микромицеты наиболее жизнеспособны по сравнению с другими условно-патогенными микроорганизмами, а поэтому и крайне опасны для человека. Быстрый рост мицелия, богатство, мощь и лабильность ферментных систем позволяет им использовать в качестве источника питания большой круг материалов как природного, так и искусственного происхождения [2].

Подобная ситуация требует от специалистов постоянного поиска новых средств биозащиты. Человек широко использует большой набор химических биоцидных средств, многие из которых выпускаются и используются в нашей стране. Однако их применение неоднозначно влияет на микроорганизмы, в том числе и на человека. Биоциды оказывают угнетающее вли-

яние на все формы живых организмов, независимо от их концентрации. Кроме того, существует и другая опасность применения биоцидных веществ. После использования по назначению они попадают в окружающую среду. Затем в процессе естественной биodeградации и рассеивания эти химические вещества вступают в контакт с огромным числом микроорганизмов, изменяя приспособительные реакции и усиливая механизмы адаптации к внешним неблагоприятным воздействиям. Так появляются новые виды, обладающие повышенным сопротивлением к воздействию биоцидов [3]. Также следует отметить, что создание каждого нового фунгицида представляет собой сложный дорогостоящий и длительный процесс. Достаточно сказать, что в среднем только 1 из 4000 соединений, испытанных в качестве потенциальных биоцидов, оказывается практически приемлемым [4]. Такая ситуация в значительной степени обусловлена чрезвычайно высокими и постоянно возрастающими требованиями к биоцидам. В числе общих требований к фунгицидам – высокая эффективность биоцидного действия, доступность и сравнительно низкая стоимость, растворимость в воде, нестабильность в природных условиях, простота применения, экологическая безопасность и низкая токсичность для человека [5].

Ввиду вышеуказанных обстоятельств, в последнее время все больший интерес специалистов в области экологической биотехнологии вызывают физические способы противодействия биоповреждениям, которые приобретают все большую актуальность.

Известно, что электрические разряды широко применяются в бактерицидных устройствах для стерилизации. Согласно литературным данным, стерилизация электрическим разрядом высокоэффективна и сравнима с используемыми химическими методами (хлорирование, фторирование или озонирование) и с УФ-облучением [6]. Ранее авторами статьи (на примере некогерентного импульсного оптического излучения искрового разряда) были исследованы биоцидные свойства высокоэнергетических электрических разрядов, отмечен высокий антимикробный эффект при обработке бактериальных культур и дрожжеподобного гриба *Candida albicans* [7, 8]. Однако по сей день открытым остается вопрос о биоцидном действии некогерентного импульсного оптического излучения на микроскопические грибы.

В связи с этим, цель настоящего исследования – изучение влияния некогерентного излучения газоразрядной плазмы импульсного искро-

вого разряда (НКИИ) на жизнеспособность зародышевых структур (спор) и мицелия ряда микромицетов – типичных представителей микофлоры внутренней среды различных помещений (промышленных, больничных, жилых). Реализация данной цели кроме фундаментального аспекта – накопления фактического материала и создания концепции механизмов действия НКИИ на рост, развитие и метаболизм микромицетов – поможет решить и важнейшую прикладную задачу современной экобиотехнологии: разработку и внедрение способов эффективной и экологически безопасной деконтаминации воздуха и поверхностей в помещениях. Представляло интерес также провести сравнительный анализ эффективности фунгицидного действия НКИИ и ультрафиолетового облучения (УФО), являющегося, как известно, «золотым стандартом» физических методов дезинфекции.

Экспериментальная часть

В качестве тест-культур использовались следующие виды микромицетов:

Alternaria alternata (Fries) Keissler ВКМ F-1120, *Aspergillus niger* van Tieghem ВКМ F-1119, *Fusarium moniliforme* Sheldon ВКМ F-136. Выбор данных видов был обоснован тем, что они являются активными деструкторами полимерных материалов различного химического состава, а также различиями в количестве содержащегося в их вегетативном талломе пигмента меланина (в списке штаммы грибов расположены по его количественному убыванию). Известно, что меланин у живых существ выполняет протекторную функцию при воздействии различных неблагоприятных факторов, в том числе и излучений [9].

Формирование импульсного искрового разряда, генерирующего некогерентное излучение оптического диапазона, осуществляли с помощью экспериментального устройства. Устройство разработано в ФГУП РФЯЦ Всероссийского НИИ экспериментальной физики (г. Саров). Энергия, подводимая к разрядному промежутку, составляла 4 Дж в 1 импульсе, длительность импульса 1–10 микросекунд. Полный поток излучения 75 кВт/м^2 распределялся по диапазонам излучения в следующих пропорциях: ультрафиолетовый диапазон (310–380 н.м.) – 17% от полного потока излучения; видимый диапазон (600–700 н.м.) – 49%; инфракрасный диапазон (более 700 н.м.) – 33%. Световая энергия излучения составляла $0.9 \times 10^{-3} \text{ Дж/см}^2$. Интенсив-

ность светового потока – 0.9 кВт/см², мощность излучения – 11 кВт (1.4×10²² фотон/с).

Источником ультрафиолетового излучения служил облучатель ультрафиолетовый кварцевый ОУФК-01 «Солнышко», производимый ОАО «ГЗАС им. А.С. Попова» (г. Нижний Новгород) Эффективный спектральный диапазон излучения: 230–400 нм. Облученность в эффективном спектральном диапазоне: 1.0 Вт/м². Генератором УФ-лучей в данном приборе является лампа бактерицидная ДРТ 125-1 (ТУ 16-675.013-83) ультрафиолетовая, разрядная, ртутная, высокого давления, дуговая, трубчатая, предназначенная для работы в установках, применяемых в медицине, биологии, сельском хозяйстве. Лампа рассчитана для работы в сети переменного тока частоты 50 Гц напряжением 220 В с соответствующим активным балластным сопротивлением.

Облучение НКИИ проводилось в течение 30 мин, что в пересчете на дозу составило 135 мДж/см², доля УФ-спектра в дозе ~23 мДж/см². Многократное облучение проводили циклически – 24 часовой цикл, состоящий из 0.5 ч. фазы облучения и 23.5 ч. темной фазы, повторяемый 3 раза, что в пересчете на дозу составило 405 мДж/см², доля УФ-спектра в дозе ~69 мДж/см².

Облучение УФО проводилось в течение 10 мин, что в пересчете на дозу составило 60 мДж/см². Многократное облучение проводили циклически – 24 часовой цикл, состоящий из 10 мин фазы облучения и 23 ч. 50 мин темной фазы, повторяемый 3 раза, что в пересчете на дозу составило 180 мДж/см².

Вышеуказанные дозы были нами подобраны экспериментально и использовались ранее [10], также данные дозы указывались и другими авторами как оказывающие биоцидное действие на микроорганизмы [11].

Оценка воздействия НКИИ и УФО на споры грибов проводилась следующим образом. Готовилась суспензия спор определённой концентрации (титра). Часть приготовленной суспензии служила контролем (проводилась имитация облучения контактом с неработающим излучателем). Другая часть облучалась НКИИ, либо УФО в зависимости от варианта эксперимента. Далее по 1 мл контрольной и опытной суспензий высевали на поверхность твёрдой питательной среды. Ингибирующий эффект (ΔT) излучения в процентах к контролю оценивали сравнением количеств колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл суспензии, выросших на поверхности среды в контроле и опыте, визуально на вторые сутки культивирования [12].

Исследование воздействия НКИИ и УФО на вегетативный мицелий грибов проводили после посадки мицелия одним уколом на чашку с твёрдой питательной средой Чапека – Докса. Опытные серии облучались, а для контрольной серии проводилась имитация облучения контактом с неработающим излучателем. Все эксперименты осуществлялись на пророщенном вегетативном мицелии без спороношений.

Для оценки эффекта многократного воздействия НКИИ и УФО на споры тест-культур микроскопических грибов и развивающийся из них мицелий на поверхность плотной питательной среды Чапека – Докса уколом высаживались споры тест-культур микромицетов и затем в течение 3-х суток проводилось однократное (1 раз в сутки) облучение НКИИ и УФО.

Подавление роста под действием излучения в процентах к контролю (ΔR) оценивалось по сравнению диаметров выросших на поверхности среды Чапека – Докса в контроле и опыте колоний на 3, 5, 7, 10 и 14 сутки культивирования [12].

Измерения проводились в нормальных лабораторных условиях: температура окружающего воздуха 20±5°C; относительная влажность 80±5%; атмосферное давление 84–106 кПа. Все эксперименты проведены как минимум в трёх биологических повторностях.

Полученные данные были обработаны с использованием методов математической статистики и представлены в средних арифметических значениях и среднеквадратичных отклонениях. Оценка достоверности различий изучаемых показателей проводилась с использованием парного *t*-критерия Стьюдента при уровне статистической значимости $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе данной работы представляло интерес изучить биоцидные возможности НКИИ по отношению к зародышевым структурам вышеуказанных тест-культур и сравнить их с таковыми у УФО. Данные по ингибирующему действию НКИИ и УФО на споры микроскопических грибов представлены в табл. 1.

Результаты данных экспериментов показали, что НКИИ способно вызывать гибель значительных количеств спор у исследованных культур; следовательно НКИИ может вызывать гибель значительных количеств спор темно- и светлоокрашенных микромицетов. Однако при сравнении фунгицидного действия НКИИ и УФО можно увидеть, что НКИИ по эффективности действия на *Alternaria alternata* ($\Delta T =$

Таблица 1

Фунгицидное действие НКИИ и УФО на споры микромицетов

Вид излучения	Вид гриба	КОЕ, мл		
		<i>Alternaria alternata</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
НКИИ	контроль	32±6	74±13	178±15
	опыт	3±1	25±3	42±2
	ΔT, %	91	66	76
УФО	контроль	59±8	180±7	131±7
	опыт	26±4	51±11	2±2
	ΔT, %	56	72	98

Таблица 2

Динамика роста мицелия грибов при воздействии НКИИ

Время, сутки	Диаметр колоний, мм								
	<i>Alternaria alternata</i>			<i>Aspergillus niger</i>			<i>Fusarium moniliforme</i>		
	контроль	опыт	ΔR, %	контроль	опыт	ΔR, %	контроль	опыт	ΔR, %
3	32.0±1.0	14.7±4.2	46	62.7±2.9	56.0±4.0	89	34.3±1.5	29.0±1.7	85
5	55.0±2.8	40.5±2.1	74	90.0±0.0	87.7±4.0	97	60.3±5.9	55.3±4.9	92
7	74.5±6.4	54.0±1.4	72	90.0±0.0	90.0±0.0	100	76.7±4.9	74.0±5.3	96
10	81.5±2.1	69.0±1.4	85	90.0±0.0	90.0±0.0	100	81.3±2.3	83.0±1.4	102
14	84.0±1.4	79.5±3.5	95	90.0±0.0	90.0±0.0	100	82.0±2.0	84.5±3.5	103

Таблица 3

Динамика роста мицелия грибов при воздействии УФО

Время, сутки	Диаметр колоний, мм								
	<i>Alternaria alternata</i>			<i>Aspergillus niger</i>			<i>Fusarium moniliforme</i>		
	контроль	опыт	ΔR, %	контроль	опыт	ΔR, %	контроль	опыт	ΔR, %
3	40.0±0.0	32.7±0.6	82	82.3±1.5	57.7±2.1	70	35.7±6.7	33.0±1.0	92
5	53.7±2.1	48.7±0.6	91	90.0±0.0	87.7±0.6	97	55.3±2.1	52.0±1.0	94
7	76.3±1.2	73.7±0.6	97	90.0±0.0	90.0±0.0	100	77.0±1.0	74.3±1.2	96
10	84.3±0.6	83.3±0.6	99	90.0±0.0	90.0±0.0	100	81.0±1.0	79.7±0.6	98
14	90.0±0.0	90.0±0.0	100	90.0±0.0	90.0±0.0	100	82.0±1.0	81.0±1.0	99

= 91%) существенно превосходит УФО ($\Delta T = 56\%$); эффективность воздействия данных излучений на *Aspergillus niger* примерно одинакова: $\Delta T = 66\%$ для НКИИ и 72% для УФО; а в действии на *Fusarium moniliforme* НКИИ ($\Delta T = 76\%$) значительно уступает УФО ($\Delta T = 98\%$). Полученные результаты позволяют утверждать, что НКИИ более эффективно инактивирует споры темноокрашенных микромицетов, чем светлоокрашенных.

Экспериментальные данные влияния облучения НКИИ и УФО на ростовые показатели мицелия тест-культур микромицетов представлены в табл. 2 и 3.

Анализируя результаты воздействия НКИИ на мицелий тест-культур, можно увидеть, что в данной дозе оно практически не оказывает какого-либо ингибирующего действия на рост грибного мицелия, однако наблюдается существенная задержка роста в опытных вариантах на 3 сутки культивирования; на 7–14 сутки в

опыте рост *Alternaria alternata* и *Aspergillus niger* становится практически идентичным контрольному, а рост *Fusarium moniliforme* даже стимулируется. Аналогичная картина наблюдается и при воздействии УФО. Вероятно, на 3–5 сутки после облучения задействуются физиолого-биохимические адаптационные механизмы микромицетов, за счет которых рост тест-культур в период с 7 по 14 сутки становится идентичным контрольному.

Известно, что грибы – очень вариabельная и подвижная в экологическом отношении группа организмов. Один из механизмов изменчивости грибов – гетерокариоз. В зависимости от условий среды число ядер того или иного типа может варьировать в гетерокариотическом мицелии, обеспечивая этим приспособляемость гриба к возникающим условиям. Это свойство грибов имеет особое значение в их экологической адаптации [13]. По нашему мнению, именно гетерокариотичность мицелия является причиной различия в

Таблица 4

Рост мицелия из трехкратно облученных НКИИ спор

Время, сутки	Диаметр колоний, мм								
	<i>Alternaria alternata</i>			<i>Aspergillus niger</i>			<i>Fusarium moniliforme</i>		
	контроль	опыт	ΔR , %	контроль	опыт	ΔR , %	контроль	опыт	ΔR , %
5	27.7±0.6	0.0±0.0	0	58.3±4.2	0.0±0.0	0	32.3±0.6	0.0±0.0	0
7	54.7±1.2	0.0±0.0	0	90.0±0.0	0.0±0.0	0	61.5±2.1	0.0±0.0	0
10	70.0±1.0	0.0±0.0	0	90.0±0.0	0.0±0.0	0	77.5±2.1	0.0±0.0	0
14	82.3±2.5	0.0±0.0	0	90.0±0.0	0.0±0.0	0	84.0±5.7	0.0±0.0	0

Таблица 5

Рост мицелия из трехкратно облученных УФО спор

Время, сутки	Диаметр колоний, мм								
	<i>Alternaria alternata</i>			<i>Aspergillus niger</i>			<i>Fusarium moniliforme</i>		
	контроль	опыт	ΔR , %	контроль	опыт	ΔR , %	контроль	опыт	ΔR , %
5	24.7±0.6	15.7±0.6	64	89.3±1.2	79.7±5	89	51.0±1.7	34.0±2.0	67
7	43.7±1.2	34.0±0.5	78	90.0±0.0	88.3±1.5	98	65.0±1.0	50.7±4.6	78
10	64.7±1.5	57.3±1.5	89	90.0±0.0	90.0±0.0	100	80.3±0.6	70.5±0.7	88
14	79.7±1.2	78.0±2.6	98	90.0±0.0	90.0±0.0	100	83.0±2.8	81.3±2.1	98

биологическом действии НКИИ на споры различных тест-культур микромицетов.

Результаты исследования эффекта троекратного циклического воздействия НКИИ и УФО на споры тест-культур микроскопических грибов и развивающийся из них мицелий представлены в табл. 4, 5.

Таким образом, показано, что троекратное воздействие НКИИ полностью ингибирует жизнеспособность зародышевых структур тест-культур микромицетов. Иная картина наблюдается при троекратном воздействии УФО: у всех тест-культур рост на 14 сутки становится идентичным росту в контроле. Следовательно, УФО и НКИИ могут применяться для инактивации зародышевых структур микромицетов-деструкторов, однако, основываясь на полученных результатах, можно с уверенностью утверждать, что за счет более интенсивного квантового выхода, при проведении дезинфекционных мероприятий применение НКИИ будет значительно эффективнее.

Выводы

1. Действие НКИИ на зародышевые структуры *Alternaria alternata* (Fries) Keissler ВКМ F-1120, *Aspergillus niger* van Tieghem ВКМ F-1119, *Fusarium moniliforme* Sheldon ВКМ F-136 в примененной нами дозе сопоставимо с действием УФО.

2. НКИИ оказывает более высокое биоцидное действие на споры темноокрашенных микромицетов по сравнению с УФО.

3. Вегетативный мицелий исследованных культур микромицетов в примененных нами дозах оказался не чувствителен к действию как НКИИ, так и УФО.

4. Троекратное воздействие НКИИ полностью ингибирует жизнеспособность зародышевых структур тест-культур микромицетов, тогда как аналогичное воздействие УФО не оказывает на них практически никакого ингибирующего действия.

5. НКИИ может быть использовано для создания нового поколения безопасных для человека и высокоэффективных стерилизующих устройств, которые могут применяться в медицине, ветеринарии и в экобиотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Нижегородской области в сфере науки и техники (договор № 21, 2010 г.) «Разработка способа для дезинфекции помещений на основе высокоэнергетических импульсных разрядов» и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (государственный контракт № 16.740.11.0035 от 01.09.2010).

Список литературы

1. Nevabainen A., Hyvarinen A., Reponen T. et al. Exposure to fungi and respiratory symptoms in moldy buildings // Human and Exp. Toxicol. 1994. V. 13. № 11. P. 810.
2. Смирнов В.Ф., Семичева А.С., Смирнова О.Н., Захарова Е.А. Агрессивные метаболиты грибов и их роль в процессе деградации материалов различного химического состава // Матер. конф. «Биологические

проблемы экологического материаловедения», Пенза, 1995. С. 82–86.

3. Кулешова Л.И., Пустоветова Е.В. Инфекционная безопасность в лечебно-профилактических учреждениях. Ростов-на-Дону: Феникс, 2006. 316 с.

4. Бочаров Б.В., Анисимов А.А., Крюков А.А. Основные средства защиты материалов от повреждений микроорганизмами. Экологические основы защиты от биоповреждений. М.: Наука, 1985. С. 172–210.

5. Нюкша Ю.П. Предохранение бумаги книг от повреждения грибами // В сб.: Теория и практика сохранения книг в библиотеке. Л.: Гос. публ. биб-ка им. М.Е. Салтыкова-Щедрина, 1983. Вып. 11. С. 5–34.

6. Schoenbach K. N., Beebe A., Buescher S. Biological Effects of High Power, Microsecond and Submicrosecond Electrical Pulses // Abstr. International Symposium «ElectroMed 99», Norfolk, Virginia, April 12–14, 1999. P. 243.

7. Иванова И.П., Заславская М.И. Бицидный эффект некогерентного импульсного излучения искрового разряда в экспериментах *in vitro* и *in vivo* // Современные технологии в медицине. 2009. № 1. С. 28–31.

8. Заславская М.И., Иванова И.П. Фунгицидный эффект некогерентного импульсного излучения при

экспериментальном оральном кандидозе крыс // Проблемы медицинской микологии. 2005. Т. 6. С. 285–286.

9. Барабой В.А. Структура, биосинтез меланинов, их биологическая роль и перспективы использования // Успехи современной биологии. 2001. Т. 121. № 1. С. 36–46.

10. Кряжев Д.В., Ичеткина А.А., Мухина Е.С. и др. Высоко- и низкоинтенсивные электромагнитные излучения как средство профилактики внутрибольничных инфекций, вызываемых микромицетами-биодеструкторами // Медицинский альманах. 2011. № 4 (17). С. 81–84.

11. Самойлова К.А. Действие ультрафиолетового излучения на клеточные структуры и метаболизм // Ультрафиолетовое излучение. 1971. № 5. С. 98–104.

12. Кряжев Д.В., Смирнов В.Ф. Новые аспекты применения низкоинтенсивных излучений (КВЧ) в экобиотехнологии // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 418–422.

13. Звягинцев Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твёрдыми поверхностями. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1973. 175 с.

**THE EFFECT OF ULTRAVIOLET RADIATION
AND RADIATION FROM PULSE SPARK DISCHARGE PLASMA
ON THE EMBRYONIC STRUCTURES AND MYCELIUM OF MICROMYCETES-DESTRUCTORS**

A.A. Ichetkina, S.V. Trofimova, D.V. Kryazhev, I.P. Ivanova, V.F. Smirnov

The effect of ultraviolet (UV) radiation and incoherent pulse radiation (IPR) on mycelium and embryonic structures of some micromycetes has been studied. The sporicidal action of IPR has been shown to be comparable to that of UV. The vegetative mycelium of the investigated test cultures has been found to be non-sensitive to the radiations applied. Three consecutive sessions of UV irradiation had no inhibitory effect on the micromycete embryonic structures, while the action of IPR completely inhibited their viability.

Keywords: biodeterioration, micromycetes, spores, mycelium, ultraviolet radiation, electric discharge, disinfection, physical methods of sterilization.