

УДК 624.071.23 + 629.3.027.531: 582.28

**А.І. Чуєнко¹, А.Г. Суббота¹, С.В. Олішевська¹,
В.А. Заславський², Н.М. Жданова¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

²Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

УРАЖЕННЯ СУЦІЛЬНОЛИТИХ ГУМОВИХ ШИН МІКРОСКОПІЧНИМИ ГРИБАМИ

Досліджено грибостійкість двох типів суцільнолитих гумових шин вітчизняного виробництва. Встановлено, що шини, до складу яких входить натуральний пластифікатор, є грибостійкими, тоді як шини із синтетичним пластифікатором є чутливими до ураження мікроскопічними грибами. За допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії показано, що внутрішні шари обох типів шин контаміновані міцелієм грибів. Одержані дані свідчать про актуальність вивчення грибостійкості шин у випадку введення нових компонентів до їх складу, та інших гумових виробів, що експортуються у країни з тропічним кліматом.

Ключові слова: грибостійкість, мікроскопічні гриби, суцільнолиті гумові шини, пластифікатори, конфокальна лазерна скануюча мікроскопія.

Показник грибостійкості безперечно має важливе значення для гумотехнічних матеріалів (ГТМ), які є основною складовою багатьох виробів, що широко застосовуються в медицині, техніці, промисловості та різних галузях господарства. Деякі з них експортуються за кордон, в тому числі і в країни з тропічним і субтропічним кліматом. Тому, особливо важливим є дослідження даних матеріалів і виробів на грибостійкість, особливо у випадку введення нових компонентів до їх складу, оскільки мікроскопічні гриби здатні інтенсивно рости та розвиватися на таких субстратах за умов підвищеної температури і вологості та, як наслідок, змінювати фізико-хімічні і механічні властивості та сприяти їх деструкції [1, 2]. Крім цього, пошкоджені матеріали та вироби стають джерелом інфікування довкілля спорами мікроскопічних грибів [3]. Нині існує велика кількість промислових матеріалів, у тому числі і виробів із гуми, ви-

© А.І. Чуєнко, А.Г. Суббота, С.В. Олішевська, В.А. Заславський, Н.М. Жданова, 2010

готовлених на основі вторинної сировини, наприклад, з гумової крихти, або зі зміненою технологією: заміною допоміжних компонентів: наповнювачів, прискорювачів вулканізації, пластифікаторів тощо [10]. Такі зміни не завжди покращують якість товару, а навпаки, можуть змінювати його фізико-хімічні властивості та знижувати грибостійкість виробів. Зокрема, пластифікатори, до складу яких входять жирні кислоти та їх похідні, можуть сприяти розвитку мікроскопічних грибів, тоді як пластифікатори з дикарбоновими кислотами є стійкими до ураження мікроскопічними грибами [1].

При виготовленні суцільнолитих гумових шин вітчизняним виробником заміна натурального пластифікатора (ПН) на синтетичний (ПС) може сприяти ураженню даних виробів мікроскопічними грибами при їх довготривалому зберіганні у природних умовах країни-експортера, що розташована в помірному кліматі.

Отже, метою роботи було вивчення стійкості суцільнолитих гумових шин та їх компонентів до ураження мікроскопічними грибами.

Матеріали та методи. *Матеріалами дослідження* були два типи суцільнолитих гумових шин ($d = 200$ мм), виготовлені на основі каучуків загального призначення. Такі шини мали однаковий компонентний склад, але різнилися за типом пластифікатора. Шини першого типу (ШН) містили натуральний пластифікатор ПН, що є високомолекулярною однорідною сполукою, шини другого типу (ШС) – синтетичний пластифікатор ПС, що є неоднорідною речовиною та містить велику кількість низькомолекулярних компонентів – жирних кислот, складних ефірів, органічних сполук фосфору. ПН і ПС, як окремі компоненти гумових шин, також були матеріалами наших досліджень.

Визначення грибостійкості шин та пластифікаторів. Дослідження грибостійкості вищезазначених виробів та матеріалів здійснювали за методом 1 ГОСТ 9.049–91 “Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов” з використанням тест-культур мікроскопічних грибів: *Aspergillus niger* van Tieghem, *A. terreus* Thom, *A. oryzae* (Ahlburg) Cohn, *Chaetomium globosum* Kunze, *Paecilomyces variotii* Bainer, *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, *P. chrysogenum* Thom, *P. funiculosum* Thom, *Trichoderma viride* Persoon [5].

Метод 1 дає змогу дослідити ріст грибів за наявності лише тих поживних речовин, які містяться в досліджуваному матеріалі. З цією метою всі шини попередньо відмивали гарячою (50 ± 10 °C) дистильованою водою [5], і, в залежності від умов проведення експерименту, розподіляли на три групи: “Контроль 1”, “Контроль 2”, “Дослід”.

Шини групи “Контроль 1” знаходилися в приміщенні лабораторії при 20 ± 2 °C і відносній вологості повітря (ВВП) 60 ± 5 %. Шини групи “Контроль 2” обприскували стерильною дистильованою водою і витримували в термостаті при 29 ± 2 °C і ВВП 100 %. Шини групи “Дослід” інфікували суспензією грибів (1×10^6 кл/мл) і витримували у термостаті при 29 ± 2 °C і ВВП 100 % [5].

Визначення грибостійкості пластифікаторів проводили за аналогічних умов, при цьому їх розміщували на дні чашки Петрі (діаметр 90 мм) по 20 мл. На поверхню зразків пластифікаторів групи “Контроль 2” наносили 1,5 мл стерильної дистильованої води, тоді як поверхню зразків групи “Дослід” заражали нанесенням 1,5 мл суспензії тест-культур вказаних вище грибів [5].

Випробування з грибостійкості тривали 28 діб. Всі дослідження проводили в трикратній повторності. Оцінку грибостійкості зразків здійснювали згідно з ГОСТ 9.049–91 за інтенсивністю розвитку грибів, детально оглядаючи зразки при освітленні 3000 лк та під бінокулярним мікроскопом МБС-10 (збільшення $\times 60$) відповідно до 6-ти бальної шкали (0–5 балів) [6]:

- 0 – проростання конідій не спостерігалось;
- 1 – реєструвалися конідії, що проросли та слабо розвинений міцелій;
- 2 – спостерігався розвинений міцелій, та незначне спороношення;
- 3 – міцелій та спороношення утворювалися інтенсивно;
- 4 – утворювалися грибні колонії, що займали менше 25 % поверхні зразків;
- 5 – чітко було видно розвиток грибів, що вкривають більше 25 % поверхні зразків.

Грибостійкими вважали зразки шин, що мали бал грибостійкості не вище 2 згідно з ГОСТ 20.57.406 – 81 [7].

Конфокальна лазерна скануюча мікроскопія. Дослідження контамінації внутрішніх шарів гумових шин мікроскопічними грибами здійснювали за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопу LSM 500 Pascal. Суть методу полягає у виникненні люмінесценції грибних структур, пофарбованих барвником, на фоні неживої матерії (гуми) при збудженні її лазерними променями з довжиною хвилі 480 нм.

Підготовку проб здійснювали наступним чином. Зразки, розміром 5×5 мм і товщиною 50–100 мкм, відбирали з поверхні та внутрішніх шарів гумових (глибина 8–25 мм) шин обох типів усіх груп дослідження. Після цього, зразки поміщали на стерильне предметне скло та обробляли спочатку цитратно-фосфатним буфером рН 5,2 протягом 15 хв., потім – барвником акридиновим оранжевим (у розведенні 1: 50000) протягом 15 хв. Надлишок барвника, що не закріпився на зразку, відмивали цитратно-фосфатним буфером протягом 5 хв. Зразок накривали стерильним покривним склом так, щоб він знаходився у товщі буферного розчину та поміщали в затискач мікроскопу [8, 9].

Результати та їх обговорення. Згідно з отриманими результатами, при візуальному огляді зразків ШН у групах “Контроль 1”, “Контроль 2” і “Дослід”, а також зразків натурального пластифікатору наприкінці терміну випробування жодних ознак ураження мікроскопічними грибами не було виявлено.

Ступінь колонізації зразків ШС у групах “Контроль 2” і “Дослід” була різною. Так, інтенсивність розвитку грибів на зразках ШС групи “Контроль 2” оцінено у 5 балів (табл. 1). В таких умовах утворювались колонії (d = 20 мм) грибів, які вкривали більше 25 % поверхні таких зразків (табл. 1). Склад мікроскопічних грибів, виділених із поверхні зразків групи “Контроль 2”, наведено нижче: *Alternaria alternata* (Fries: Fries) von Keissler, *Aspergillus carneus* Blochwitz et al., *A. flavus* Link: Fries, *A. fumigatus* Fresenius, *A. sydowii* (Bainier et Satory) Thom et al., *A. ustus* (Bainier) Thom et Church, *A. versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Fusarium poae* (Peck) Wollenweber, *Paecilomyces lilacinus* Thom (Samson), *Penicillium* sp. Link [11]. Ступінь грибостійкості зразків ШС групи “Дослід” був нижчим і становив 4 бали (табл. 2). У цьому випадку колонії (d = 50 мм) стандартних тест-культур *P. chrysogenum* і *T. viride* займали менше 25 % поверхні зразків ШС (табл. 1).

Таблиця 1

Оцінка грибостійкості суцільнолитих гумових шин та пластифікаторів

Найменування зразків			Ступінь грибостійкості, у балах	
			Вимоги до матеріалу згідно ГОСТ 20.57.406 – 81	Результати випробувань
Суцільнолита гумова шина з пластифікатором	Натуральний	“Контроль 1”	2	0
		“Контроль 2”	2	0
		“Дослід”	2	0
	Синтетичний	“Контроль 1”	2	0
		“Контроль 2”	2	5
		“Дослід”	2	4
Пластифікатор	Натуральний	“Контроль 1”	–	0
		“Контроль 2”	–	0
		“Дослід”	–	0
	Синтетичний	“Контроль 1”	–	0
		“Контроль 2”	–	5
		“Дослід”	–	4

Примітка: «–» – відсутність інформації щодо вимог грибостійкості матеріалу.

При дослідженні грибостійкості кожного з пластифікаторів окремо було встановлено, що ПН був стійким до ураження мікроскопічними грибами (0 балів), а ПС – нестійким (5 і 4 бали у групах “Контроль 2” і “Дослід” відповідно) (табл. 1). Слід зазначити, що кількість видів грибів, які викликали ураження ПС була значно меншою ніж тих, що колонізували шини.

Поряд із цим *A. niger*, *A. flavus* і *Penicillium* sp. домінували у групі “Контроль 2”, *A. niger* і *A. oryzae* – у групі “Дослід” (табл. 1).

Таким чином, за відсутності штучного ураження суспензією тест-культур (група “Контроль 2”) зразки шин були контаміновані грибами значно інтенсивніше, ніж у випадку обробки зразків такою суспензією (група “Дослід”). Це свідчить, що матеріал містить поживні речовини, які сприяють розвитку грибів на поверхні і всередині виробів.

Беззаперечним доказом існування внутрішньої контамінації шин є результати конфокальної лазерної скануючої мікроскопії (рис. 1,2).

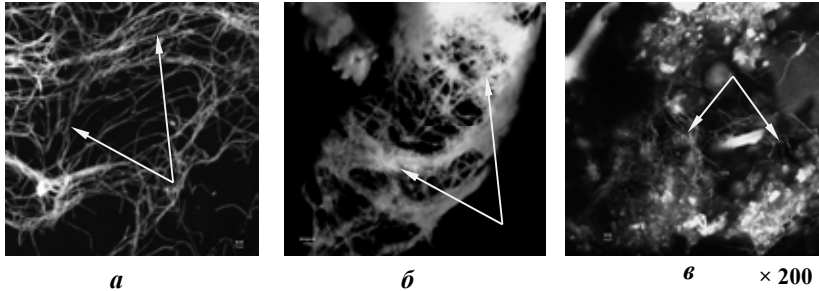


Рис. 1. Ураження зразків ТН (глибина 25 мм) гіфами грибів (позначено стрілками):
а – група “Контроль 1”, б – група “Контроль 2”, в – група “Дослід”

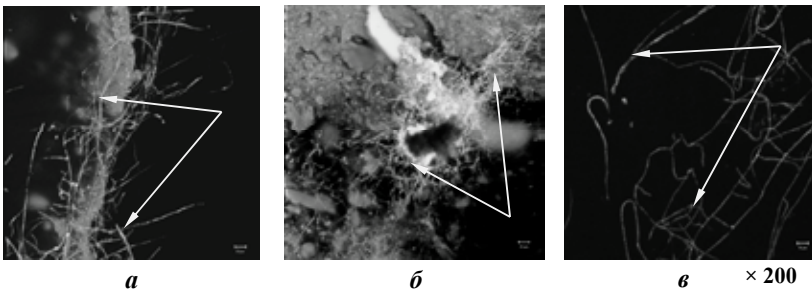


Рис. 2. Ураження зразків ТШ (глибина 25 мм) гіфами грибів (позначено стрілками):
а – група “Контроль 1”, б – група “Контроль 2”, в – група “Дослід”

Міцелій грибів був виявлений у всіх зразках досліджених типів шин. Товщина гіф знаходилася в межах 5–10 мкм. Довжина гіф не вимірювалася через нерівномірність їх розташування у товщі зразків. Необхідно зазначити, що наявність спор спостерігали лише на поверхні зразків ТШ групи “Дослід” та “Контроль 2” (рис. 3).

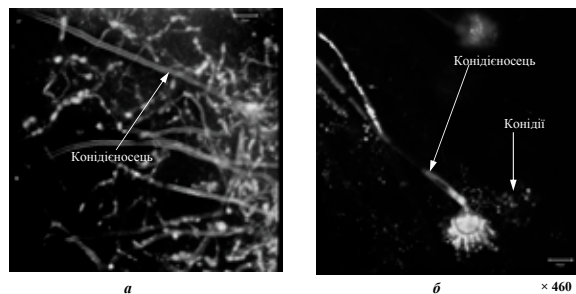


Рис. 3. Розвиток мікроскопічних грибів р. *Aspergillus* на поверхні зразків ТШ:
а – група “Контроль 2”, б – група “Дослід”

Таким чином, причиною зниження грибовстійкості досліджених об’єктів могла бути заміна ПН, який не сприяє росту мікроскопічних грибів, на ПС, що стимулює їх ріст. Тобто, ПН та шини, до складу яких він входить, є грибовстійкими, на відміну від ПС та шин з його вмістом, що є не грибовстійкими. Одержані нами дані підтверджуються даними літератури [1,12,13].

Відомо, що росту мікроорганізмів, у тому числі і мікроскопічних грибів, сприяє неоднорідність ПС і наявність у їх складі рослинних і тваринних жирів (льняна і соєва олія),

а також надлишок жирних кислот, ацетатів, бутиратів, олеатів, похідних парафіну та стеарину, дибутилфталату, дибутилсебацінату тощо [1]. Наявність низькомолекулярних компонентів в складі пластифікатору може індукувати утворення ферментів, здатних руйнувати такі легкодоступні сполуки [12, 13]. Цим, певно можна пояснити чутливість зразків ШС до дії мікроскопічних грибів.

Однорідні пластифікатори на основі високомолекулярних смол відносять до категорії речовин, які є важкодоступними для засвоєння і мають фунгіцидну дію [13]. Вірогідно, що застосування ПН у виготовленні зразків ШН обумовлює їх стійкість до ураження мікроскопічними грибами.

Відомо, що мікроорганізми можуть існувати на ГТМ лише тоді, коли до їх складу входять речовини органічного походження, які необхідні для росту і розвитку мікроскопічних грибів, або коли матеріал забруднений такими речовинами. Наявність лише одного компонента, нестійкого до ураження мікроскопічними грибами, може призвести до зниження грибостійкості решти компонентів [1], що було відмічено і у нашій роботі при заміні виробником суцільнолитих гумових шин ПН на ПС.

При порівнянні видового складу мікобіоти деяких компонентів таких шин (гумової крихти, гумової суміші і ПС), досліджених нами раніше [11] з мікобіотою поверхні зразків ШС групи “Контроль 2” встановлена їх подібність щодо домінуючих видів – *A. flavus*, *A. sydowii* та *A. alternata*. Тобто, при ВВП 100 % посилюється ріст грибів, якими були контаміновані основні компоненти ШС.

Важливу роль у формуванні видового складу мікроорганізмів, у тому числі грибів, на ГТМ, відіграє мікробний антагонізм [14]. Більшість видів роду *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*), *T. viride* і *P. funiculosus* є активними антагоністами за рахунок продукування антибіотиків з антифунгальною дією [15]. Показано, що сильні антагоністи пригнічують сумісні культури і нейтральна взаємодія відбувається з такими ж сильними антагоністами, наприклад, *A. niger* і *T. viride* або *P. funiculosus* і *Ch. globosum* [15]. Спираючись на викладені вище дані можна припустити, що у наших дослідженнях при обробці споровою суспензією тест-культур зразків ШС наприкінці досліду активно розвивалися лише *P. chrysogenum* і *T. viride*, які зберігали між собою нейтральні взаємовідносини, тоді як відносно до інших тест-культур та до видів, якими була контамінована внутрішня частина зразків шин, вірогідно, вони були активними антагоністами.

В інших дослідженнях [16] було показано, що антагоністичні відносини між тест-культурами грибів можуть занижувати об'єктивність оцінки грибостійкості виробу. Вважаємо, що антагоністичні відносини між тест-культурами грибів, що використовуються для вивчення стійкості ГТМ та видів грибів, що їх контамінують, потребують ретельного вивчення, що планується в нашій подальшій роботі.

Згідно з даними літератури, стійкість ГТМ, окрім стійкості окремих компонентів гумових сумішей (каучуку, наповнювача, вулканізатора тощо), залежить від наступних факторів: вологості каучуку (ріст грибів посилюється при вологості субстрату 0,8 % і вище), сумісності компонентів, технології виготовлення сирих гумових сумішей і переробки їх у ГТМ [1].

Так, каучуки загального призначення (натуральний, бутадієновий, ізопреновий, бутилкаучук), що набули широкого вжитку в побуті та легкій промисловості, і були застосовані для виготовлення суцільнолитих гумових шин, характеризуються низькою стійкістю до ураження мікроскопічними грибами, на відміну від каучуків спеціального призначення (бутадієнітрильний та хлоропреновий), що використовуються для виготовлення ГТМ, які мають підвищені вимоги до впливу факторів довкілля і є грибостійкими [10].

Умови виготовлення досліджених суцільнолитих гумових шин є досить жорсткими для мікроскопічних грибів. Зокрема, процес вулканізації для більшості виробів відбувається при 140–200 °С протягом 5–10 хв [17], внаслідок чого відбувається їх загибель. Тому, цей факт наводить на думку про те що наявність внутрішньої контамінації шин обумовлена недотриманням параметрів вулканізації.

Одержані нами дані підтверджують необхідність обов'язкового вивчення мікобіоти та грибостійкості усіх компонентів у складі виробів із гуми, застосування яких передбачається новими технологіями. Вважаємо, що для об'єктивної оцінки грибостійкості ГТМ стандартними тест-культурами мають бути саме ті види грибів, які виділені з даного матеріалу. Крім

того, при проведенні випробувань на грибостійкість ГТМ необхідно подовжувати тривалість випробувань, що дозволить виявити зміни фізико-хімічних властивостей матеріалу, які можуть виникнути внаслідок життєдіяльності грибів.

*А.И. Чуенко¹, А.Г. Суббота¹, С.В. Олишевская¹,
В.А. Заславский², Н.Н. Жданова¹*

¹*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев*

²*Институт ботаники им. М.Г. Холодного НАН Украины, Киев*

ПОРАЖЕНИЕ ЦЕЛЬНОЛИТЫХ РЕЗИНОВЫХ ШИН МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ

Резюме

Исследована грибостойкость двух типов цельнолитых резиновых шин отечественного производства. Показано, что шины, в состав которых входит натуральный пластификатор, являются грибостойкими, тогда как шины с синтетическим пластификатором чувствительны к поражению микроскопическими грибами. С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показано, что внутренние слои двух типов шин контаминированы мицелием грибов. Полученные данные свидетельствуют об актуальности изучения грибостойкости шин в случае введения новых компонентов в их состав, и других резиновых изделий, которые экспортируются в страны с тропическим климатом.

Ключевые слова: грибостойкость, микроскопические грибы, цельнолитые резиновые шины, пластификаторы, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

*A.I. Chuenko¹, A.G. Subbota¹, S.V. Olishvska¹,
V.A. Zaslavsky², N.M. Zhdanova¹*

¹*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

CONTAMINATION OF UNIT CAST RUBBER TYRES BY MICROSCOPIC FUNGI

S u m m a r y

The main peculiarities of fungal resistance of two types of unit cast rubber tyres of domestic manufacture have been investigated. Rubber tyres which contained synthetic plasticizer were non-resistant to fungal contamination in contrast to ones with natural plasticizer. Using the method of confocal laser-scanning microscopy, it was shown that inner layers of two types of rubber tyres were contaminated with fungal mycelium. Our findings indicate that the investigation of microscopic fungi resistance of new materials is necessary for general mechanical rubber goods, especially exported to tropical climate countries.

The paper is presented in Ukrainian.

К е y w o r d s: fungal resistance, microscopic fungi, unit cast rubber tyres, plasticizers, confocal laser-scanning microscopy.

The authors' address: *A.I.Chuenko*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Петруйова А., Занова В.* Роль состава резиновых смесей при биологическом разрушении резиновых изделий // *Каучук и резина*. – Москва: Госхимиздат, 1960. – № 2. – С. 16–17.
2. *Лугаускас А.Ю., Микульскене А.И., Шляужене Д.Ю.* Каталог микромицетов – биодеструкторов полимерных материалов. – Москва: Наука, 1987. – 341 с.
3. *Кондратюк Т.А., Коваль Э.З., Рой А.И.* Поражение микромицетами различных конструкционных материалов // *Микробиол. журнал*. – 1986. – **48**, № 5. – С. 57–60.
4. *Каневская И.Г.* Биологическое повреждение промышленных материалов. – Ленинград: Наука, 1984. – 232 с.
5. *ГОСТ 9.049 – 91.* Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. – Введ. 28. 12. 91.
6. *ГОСТ 9.048 – 89.* Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. – Введ. 26. 06. 89.
7. *ГОСТ 20.57.406 – 81.* Изделия электронной техники, квантовой электроники и электротехнические. Методы испытаний. – Введ. 01.01.82.

8. *Билый В.И.* Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
9. *Matsumoto V.* Methods in cell biology.– San Diego: Acad. press, 2002. – V. 70. – 507 p.
10. *Ильичев В.Д., Бочаров Б.В., Горленко М.В.* Экологические основы защиты от биоповреждений. – М.: Наука, 1985. – 264 с.
11. *Суббота А.Г., Чуенко А.И., Наконечная Л.Т.* Грибное поражение резинотехнических изделий // IV Міжнародна науково-практична конференція (Алушта, 8 – 12 вересня 2008 р.): Зб. статей. – Харків: Райдер, 2008. – Т. 1. – С. 114-119.
12. *Рудакова А.К.* Поражение микроорганизмами полимерных материалов и способы их предупреждения // Микроорганизмы и низшие растения – разрушители материалов и изделий. – М.: Наука, 1979. – С. 28–32.
13. *Рудакова А.К., Биткина Т.А., Выродова В.В.* Стойкость полимерных материалов, применяемых при изготовлении кабелей и проводов, к воздействию плесневых грибов // Биоповреждения, методы защиты. – Полтава, 1984. – С. 158–164.
14. *Горленко М.В.* Некоторые биологические аспекты биодеструкции материалов и изделий // Биоповреждения, методы защиты. – Полтава, 1984. С. 3–11.
15. *Туркова З.А., Титкова О.А.* Взаимоотношения видов грибов, применяемых для испытаний технических изделий и их антибиотические свойства // Микроорганизмы и низшие растения – разрушители материалов и изделий. – М.: Наука, 1979. – С. 33–46.
16. *Кряжев Д.В.* Экологические и физиологические аспекты деструкции микромицетами композиций с регулируемой грибостойкостью на основе природных и синтетических полимеров: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Нижний Новгород, 2005. – 23 с.
17. *Аверко-Антонович Ю.О., Омельченко Р.Я., Охотина Н.А., Эбич Ю.Р.* Технология резиновых изделий. – Л.: Химия, 1991. – 352 с.

Отримано 09.10.2009