

И. Г. Калинина, К. З. Гумаргалиева, Г. Е. Заиков,
О. В. Стоянов

КИНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ АДГЕЗИИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ К ПОВЕРХНОСТИ МЕТАЛЛОВ

Ключевые слова: биодеструкция, микроскопические грибы, адгезия, конидии.

Проведена количественная оценка прочности адгезионной связи (сродства) поверхность металла – споры микроорганизмов и их природы связи. Полученные результаты свидетельствуют о том, что основная характеристика адгезии – сила адгезии увеличивается со временем, достигая равновесного значения и определяется природой поверхности материала и видом микроскопического гриба.

Keywords: biodegradation, microscopic fungi, adhesion, conidia.

The quantitative assessment of the strength of the adhesive bond (affinity) between metal surface and spores of microorganisms and their natural connection was studied. The results indicate that the main characteristic of adhesion - the adhesive force increases with time, reaching an equilibrium value, and determines by the nature of surface and the microscopic view of the fungus.

В современных условиях экологически нагруженной внешней среды и быстрой адаптации различных видов микроорганизмов к изменяющимся условиям среды, с одной стороны, и накопления различных отходов материалов синтетического происхождения, с другой стороны, необходимы исследования в области разработки как быстроразлагающихся материалов в случае необходимости их утилизации так и стойких материалов в случае защиты от биоразрушения. Современное состояние проблемы подтверждает необходимость изучения природы адгезионного взаимодействия на границе раздела: материал – стенка клетки микроорганизма, с попыткой количественной оценки этого процесса [1 -5].

Процессу биодеструкции – биоповреждению предшествуют две стадии: адгезия или прикрепление микроорганизмов к поверхности материала с последующим ростом биомассы микроорганизма в результате утилизации субстрата – подложки. Эти две стадии определяют последующие процессы разрушения материала. Адгезированные клетки микроорганизмов действуют как агрессивные биоагенты в результате выделения экзоферментов или других низкомолекулярных веществ, организующих так называемую биопленку. Поэтому количественные параметры адгезии, в свою очередь, являются определяющими для скоростей биообращения и биоразрушения материалов [6 - 9], в том числе и металлических конструкций.

Биоповреждения металлов и металлоконструкций принято называть биокоррозией или микробиологической коррозией металлов. Основные стадии микробиологической коррозии - это транспорт микроорганизмов из воздушной, водной среды или из почвы на поверхность металла - конструктивных изделий с последующей адгезией (прилипанием). Необратимость адгезии микроорганизмов на поверхность определяется прочностью адгезионного взаимодействия спор микроорганизмов с поверхностью металла, характером загрязнений и условиями эксплуатации, организацией биопленки на границе раздела, определяющей сродство адгезирующих

поверхностей подложки, клеточной стенки и раствора веществ – нутриентов [10].

Реагенты и продукты электрохимических реакций, встречающиеся на металлической поверхности взаимодействуют с реагентами и продуктами микробиальных, метаболических процессов, встречающихся в биопленках комплексным путем, некоторые из этих взаимодействий ускоряют коррозию, а некоторые могут ингибировать ее [11]. Не существует универсального механизма микробиально вызванной коррозии, позволяющего разработать математические модели процессов коррозии, учитывающие значимость физико - химических факторов [12-15].

Целью нашей работы поэтому явилась количественная оценка прочности адгезионной связи (сродства) поверхность металла – споры микроорганизмов, природы связи.

Методика эксперимента

Микроскопические грибы выращивали на агаризованной среде Чапека – Докса при температуре 30°C в течение 14 суток, конидии отбирали смывом дистиллированной водой, использовали суспензию в воде с титром $10^6 - 10^7$ клеток в 1мл. Перечень и характеристика использованных в эксперименте металлов, определяющая их способность к окислению приведены в таблице 1.

Образцы листовых металлов размером 65 x10 мм подвергали холодной пластической деформации в цилиндрических валках на 20 – 30 %. Образцы очищали в течение 30 мин в растворе детергента и столько же в деионизованной воде меняя ее трижды, проводя оба процесса либо при кипячении (способ а), либо при комнатной температуре (способ б), затем промывали ацетоном марки хч и высушивали в эксикаторе. Для алюминия и цинка, которые легко окисляются, обработка по способу (а) дает в сравнении со способом (б) увеличение γ_{∞} (передельного числа адгезии) на 15 %. Для трудно окисляющихся металлов картина обратная, поэтому в основных опытах все металлы очищали способом (б).

Таблица 1 - Характеристика металлов

Металл	Марка	Состав, %	Свободная энтальпия образования окислов N°, 298 К
Алюминий	А999	99,999	-400,50 (Al ₂ O ₃)
Вольфрам	ОСЧ	99,999	-140,94 (WO ₂)
Медь	МОО	99,999	-37,23 (CuO)
Железо Армко	ОСЧ	-	-197,3 (Fe ₂ O ₃)
Молибден	ОСЧ	99,999	-140,8 (MoO ₂)
Никель	ОСЧ	99,999	-57,3 (NiO)
Платина	ОСЧ	-	-
Свинец	ОСЧ	-	-51,94 (PbO, желтый)
Серебро	ОСЧ	-	-7,42 (Ag ₂ O)
Тантал	ТВЧ	-	-
Титан	ВТ 1 – 00		-225,50 (TiO ₂) -123,9 (TiO)
Цинк	ЦВЧ	99,999	-83,24 (ZnO)
Золото	ОСЧ	99,999	

На очищенный образец наносили 0,1 мл суспензии конидий микроскопических грибов в расчете $10^5 - 10^6$ клеток на образец. Затем 20 мин высушивали при комнатной температуре с помощью вентилятора и выдерживали в эксикаторе при 22° С и относительной влажности 95 % воздуха в течение различного времени.

Адгезию конидий к металлу оценивали методом центрифугального отрыва в водной среде [16, 17]. Для этого образцы пластичных металлов и фольги приклеивали к твердой подложке клеем, чтобы исключить деформацию при центрифугировании. Пластины жестких металлов помещали непосредственно в центрифужный стакан. Образцы металлов с нанесенными и высушенными конидиями выдерживали в эксикаторе при относительной влажности 95 % (от 30 мин до 5 суток), центрифугировали в водной среде, трехкратно повторяя каждый опыт. Центрифуга марки К-24 JANEZKI, частота вращения от 1000 до 18000 об/мин в течение 10 мин. Число конидий, необратимо адгезированных, определяли микроскопическим методом, используя счетную камеру Горяева. При исследовании взвеси спор подсчитывали количество спор или конидий в единице объема жидкости. По числу конидий, оставшихся после центрифугирования, нельзя судить о прочности их прикрепления к поверхности, поэтому более точное представление о прочности связи конидий с поверхностью дает величина «числа адгезии» - γ . «Числом адгезии» называют долю конидий, оставшихся на образце после центрифугирования, выраженную в процентах:

$$\gamma = (1 - N/N_0) \cdot 100, \% \quad (1)$$

где N_0 – число конидий, нанесенных на образец, а N – число оторвавшихся конидий.

Предельным γ_∞ считали значение γ , которое не изменяется в данном силовом поле независимо от

времени выдерживания конидий на образце и центрифугирования. Время достижения стационарной скорости вращения ротором центрифуги составляло три минуты, длительность опыта - 10 мин.

Из интегральных кривых распределения конидий по силам адгезии, характеризующих зависимость доли оторвавшихся частиц от силы отрыва, определяли силу, соответствующую отрыву 50 % конидий от общего числа всех адгезированных на поверхности металла конидий, которую рассчитывали по формуле:

$$F_{50} = \pi^3 / 675 \cdot R \cdot (\rho_{\text{кл}} - \rho_{\text{ср}}) \cdot \omega^2 \cdot r^3, \text{ дин / клетку}, \quad (2)$$

где $\rho_{\text{ср}}$ – плотность среды (вода), $\rho_{\text{кл}}$ – плотность конидий, равная 1,15 г / см³, $R = 4$ см – радиус ротора центрифуги, ω – угловая скорость вращения ротора центрифуги - число оборотов в минуту, r – радиус конидий *Trichoderma viride*, равный $(3 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$ см.

Результаты и их обсуждение

Отработку методических вопросов нанесения, высушивания суспензии микробных клеток на поверхность металла, оптимального времени и условий центрифугирования, электронно-микроскопическое изучение кинетики адгезии клеток, проводили при изучении адгезии *Raecilomyces varioti* (средний радиус споры - 5,5 мкм) на алюминиевых подложках. На рис.1 приведены кинетические кривые адгезии конидий *Raecilomyces varioti* при различных температурных режимах адгезии, откуда следует, что наиболее благоприятным температурным режимом является температура 22° С при влажности 95%. Из микроскопических наблюдений обнаружили, что споры *Raecilomyces varioti* отрываются при незначительном усилии (угловая скорость вращения центрифуги 1000 об/мин) слипшимися группами вследствие того, что сила сцепления конидий между собой превосходит силу адгезии к подложке. Примеры экспериментальных кривых при изучении адгезии *Trichoderma viride* к некоторым металлическим поверхностям приведены на рис. 2 и 3.

При анализе экспериментальных кривых процесса адгезии на рис. 1 и 3, на одинаковую алюминиевую подложку, но разных по размеру и форме микроскопических грибов, видим огромную разницу в количественных параметрах, вызванную существенным влиянием морфологии и размеров спор, неоднородностью поверхности подложки. Из этих результатов следует, что количественно изучать процесс адгезии необходимо с помощью конидий *Trichoderma viride*, которые сильнее прикрепляются к металлической подложке в отличие от конидий *Raecilomyces varioti*, что немаловажно при центрифугальном изучении процесса адгезии.

Адгезию конидий *Trichoderma viride* к поверхности металла характеризовали двумя параметрами: γ_∞ и F_{50} . Кинетические кривые адгезии конидий *Trichoderma viride* к различным металлам представлены на рис.4, количественные параметры адгезии (значения γ_∞ и F_{50}) приведены в таблице 2.

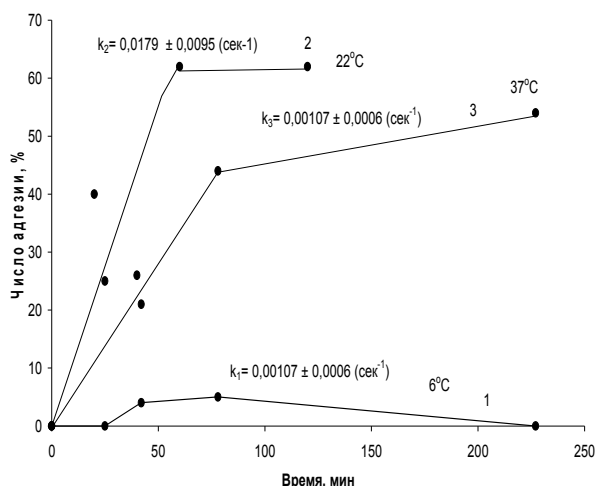


Рис. 1 - Кинетические кривые адгезии конидий *Raecilomysces varioti* к алюминиевой подложке при относительной влажности воздуха 95% и различных температурах: 1- 6°C, 2- 22°C, 3 – 37°C, угловая скорость вращения центрифуги – 1000 об/мин, время центрифугирования – 15 мин, в воде.

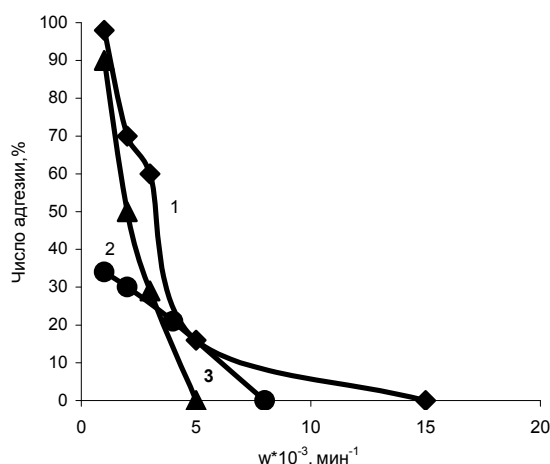


Рис. 2 - Распределение числа адгезии конидий *Trichoderma viride* в зависимости от угловой скорости вращения центрифуги на поверхности металлов: 1-золото, 2 – титан, 3 - кремний при 22°C, относительная влажность воздуха 95 %, время выдержки конидий на поверхности металла – 24 часа

Константы скорости формирования адгезионных сил (рис. 4) из – за соизмеримости времени высыхания капли суспензии конидий *Trichoderma viride* на воздухе со временем выхода на плато трудно определить с достаточной точностью.

Изученные металлы по адгезионным параметрам можно разделить на две группы: первую характеризуют $F_{50} \geq 10^{-4}$ дин / кл.; вторую F_{50} от 10^{-5} до 10^{-7} дин /кл.. Большую роль играет предыстория поверхности, например, на никеле, подвергнутом холодной пластической деформации $\gamma_{\infty} = 79 \pm 8 \%$, а $F_{50} = 2,0 \cdot 10^{-4}$ дин / кл., а на никеле, выдержанном 1 ч при температуре 700° и давлении 10^{-4} мм рт.ст., $\gamma_{\infty} = 50 \pm 2\%$, а $F_{50} = 8,2 \cdot 10^{-4}$ дин / кл.

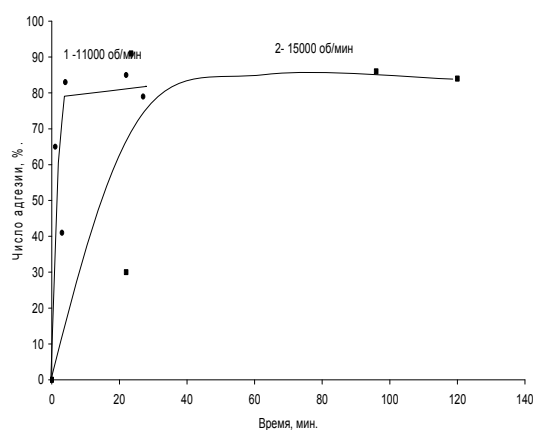


Рис. 3 - Кинетические кривые адгезии конидий *Trichoderma viride* к алюминиевой подложке при разных угловых скоростях центрифугирования, температура 22° С, относительная влажность воздуха 95 %.

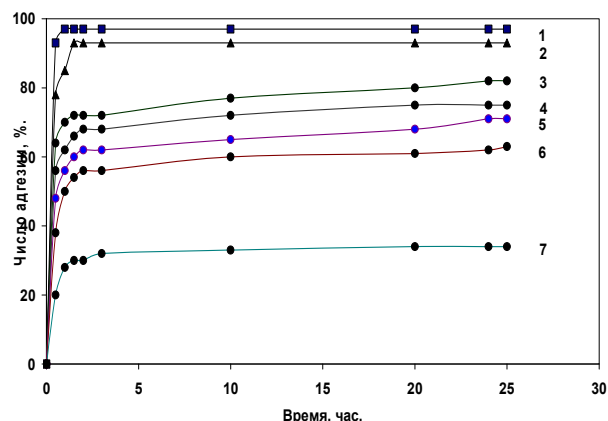


Рис. 4 - Кинетические кривые адгезии конидий *Trichoderma viride* к различным металлам, температура 22°C, относительная влажность воздуха 95%, при угловой скорости вращения центрифуги 15000 об/мин: 1 – цинк, 2 – медь, 3 – алюминий, 4 – никель, 5 – титан, 6 – тантал, 7 – молибден

Таблица 2 - Средние значения адгезионных параметров конидий *Trichoderma viride* при $T = 22^\circ\text{C}$ и $\omega = 15000$ об / мин. в водной среде к металлам, обработанным в растворе: а) кипячением, б) при температуре 22 °C

Металлы	а		б	
	$\gamma_{\infty}, \%$	$F_{50}, \%$	$\gamma_{\infty}, \%$	$F_{50}, \%$
Алюминий	95 ± 5	-	82 ± 5	$3,0 \cdot 10^{-4}$
Вольфрам	0	$1,86 \cdot 10^{-7}$	0	$1,9 \cdot 10^{-7}$
Золото	-	-	25 ± 5	$2,3 \cdot 10^{-5}$
Медь	85 ± 3	$4,1 \cdot 10^{-4}$	93 ± 7	$5,8 \cdot 10^{-4}$
Молибден	-	-	34 ± 5	$7,4 \cdot 10^{-5}$
Никель	62 ± 5	$1,67 \cdot 10^{-4}$	79 ± 8	$2,0 \cdot 10^{-4}$
Платина	-	-	53 ± 5	$2,2 \cdot 10^{-4}$
Свинец	96 ± 2	$7,00 \cdot 10^{-4}$	100 ± 1	$7,0 \cdot 10^{-4}$
Серебро	-	-	78 ± 5	$5,0 \cdot 10^{-4}$
Тантал	63 ± 8	$2,97 \cdot 10^{-4}$	65 ± 10	$2,5 \cdot 10^{-4}$
Титан	76 ± 5	$1,35 \cdot 10^{-4}$	71 ± 3	$9,0 \cdot 10^{-5}$
Цинк	100	-	97 ± 3	$6,7 \cdot 10^{-4}$

Минимальная адгезия наблюдается на золоте, вольфраме и молибдене, максимальная – на цинке, свинце и меди. Алюминий и титан занимают промежуточное положение.

В целом ряд по уменьшению предельного числа адгезии выглядит следующим образом: Pb > Zn > Cu > Al > Ni > Ag > Ti > Pt > Mo > Au > W; а по уменьшению значений силы 50 % - ого отрыва конидий: Pb > Zn > Cu > Ag > Al > Ti > Pt > Ni > Ti > Mo > Au > W.

Таким образом, к металлам, которые в условиях эксперимента не окисляются и не образуют оксидов, например, золото, конидии *Trichoderma viride* практически не адгезируют.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что основная характеристика адгезии – сила адгезии увеличивается со временем, достигая равновесного значения и определяется природой поверхности материала и видом микроскопического гриба. Также отмечен экспериментальный факт распределения сил адгезии в зависимости от приложенного напряжения. Этот эффект не был изучен ранее и вероятно обусловлен как неоднородностью поверхности материала, так и неоднородностью самих конидий по размерам [18].

При изучении адгезии грибных спор на полимерных материалах нами было показано, что адгезионные свойства внешней стенки спор микроскопических грибов зависят от соотношения белково – липидных компонент. При этом кинетические параметры процесса адгезии, рост величины силы адгезии определяются количеством белковой компоненты. В случае металлической поверхности, аналогично полимерной подложке, рост силы адгезии определяется электрохимическим потенциалом или степенью окисляемости металла. Таким образом, процесс адгезии микроскопических грибов к металлам - многофакторный процесс, требующий дальнейших исследований с учетом физико – химических свойств как подложки, так и адгезирующего агента. Для прогнозирования биостойкости полимерных и металлических конструкционных материалов необходимо знание макрокинетических параметров, описывающих адгезию.

Литература

1. Калинина И.Г., Белов Г.П., Гумаргалиева К.З., Петрунок Ю.С., Семенов С.А.. Сравнительное исследование термоокисления, фото - и биодеструкции статистическо-

- го сополимера этилена с монооксидом углерода. Ж. Химическая физика. 2011.-N2.-С.1– 9.
2. Гумаргалиева К.З., Калинина И.Г. Материаловедческие основы биодеструкции полимерных материалов.// Полимерные материалы.- 2010.- NN 7-8.- С.58-62.
3. Гумаргалиева К.З., Калинина И.Г. Материаловедческие основы биодеструкции полимерных материалов (часть II). // Полимерные материалы. 2010. N 10 с.18-24
4. Microbiologic adhesion and aggregation /Ed. By Marschall K.C. Berlin etc.: Sprinser Verlag, 1984.- P.124.
5. K.Z. Gumargaliev and G. E. Zaikov. Biodegradation and Biodeterioration of Polymers: Kinetical Aspects.Nova Science Publishers, Inc. Commack, New York.- 1998.- P. 409.
6. Onose H., Miyazaki T., Nomoto S. // J. Dent. Res.- 1980.- V. 59.- N7.- P. 1179.
7. Gordon A.S., Gerchakov S.M., Udey L.R. // Canad. J. Microbiol. 1981. V. 27. N7. P. 698.
8. Marchall K. C., Stout R. and Mitchell R. //J. of Gen. Microbiology. 1971. V. 68. P. 337.
9. Boyle P.J., Walch M., Mitchell R. // VIII Internat. Congr. Of Microbiology: Program and abstracts. Boston: Internat. Union of Microbiol. Soc.- 1982.- P. 75.
10. Lewandowski Z., Beyenal H., Fundamentals of biofilm reseach.- 2007. CRC.
11. Z. Lewandowski, H. Beyenal, Mechanisms of Miicrobial- ly Influenced Corrosion, Springer – Verlag Berlin Heidelberg.- 2008.
12. Beech I. B., Sunner J. A., Hiraoka K, Int Microbiol.- 2005.- V. 8.- P. 157 – 168.
13. Flemming H. C., Wingender J, Water Sci Technol, 2001, v. 43, pp. 9 – 16.
14. Miyanaga K., Terashi R., Kawai H., Unno H., Taji Y, Biotechnol. Bioeng.- 2007.- V. 97.- P. 850 – 857.
15. Starosvetsky J., Starosvetsky D., Armon R.// Eng. Fail Anal.- 2007.- V. 14.- P. 1500 – 1511.
16. Зимон А. Д. Адгезия пыли и порошков. М.: Химия.- 1976.- С. 430.
17. Schauersberger J., Amon M., Aichinger D. and Apostoulos Georgopoulos. // J. of Cataract and Refractive Surgery.- 2003.-V. 29, N2.-P.361.
18. К. З. Гумаргалиева, И. Г. Калинина, С. А. Семенов // Биоповреждения материалов. Адгезия микроорганизмов на поверхности материалов // Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. - М.: Химия.- 2005.- С. 596 – 619.
19. Смирнов В. Ф., Семичева А. С.// Матер. Конф. Биологические проблемы экологического материаловедения.- Пенза, 1995.- С. 79.
20. Oppermann F. B., Pickartz S. and Steinbuchel A. // Polym. Degrad. And Stabilyty.- 1998.- V. 59. N1-3.- P. 337.
21. Gallardo – Moreno A. M., Gonzblez M. L., Bruque J. M. And Pijrez C.- Giraldo. // 1 – st Int. Meeting on bAppl. Phys. Colloids and Surfacesw A.: Physicochemical and Engineering Aspects.- 2004.- V. 249. N 1 – 3.- P. 99.