

УДК 678.643.425.033:620.193.8

**Строганов В.Ф.** – доктор химических наук, профессор

E-mail: svf08@mail.ru

**Куколева Д.А.** – ассистент

E-mail: daria-zd@rambler.ru

**Казанский государственный архитектурно-строительный университет**

Адрес организации: 420043, Россия, г. Казань, ул. Зелёная, д. 1

**Перушкина Е.В.** – кандидат технических наук, доцент

**Казанский национальный исследовательский технологический университет**

Адрес организации: 420015, Россия, г. Казань, ул. К. Маркса, 68

### **Сравнительное исследование влияния микроорганизмов и сред, моделирующих продукты жизнедеятельности микроорганизмов, на цементно-песчаный раствор**

#### **Аннотация**

Выполнены исследования влияния модельных растворов органических кислот – метаболитов жизнедеятельности микроорганизмов, которые сопоставлены с влиянием активных опытных систем микроорганизмов на цементно-песчаный раствор (ЦПР). Оценку степени биологической коррозии проводили по уровню снижения прочности образцов из ЦПР.

**Ключевые слова:** биоразрушение, биокоррозия, активный ил, сероокисляющие бактерии, цементно-песчаный раствор.

#### **Введение**

Проблема биологического повреждения изделий из минеральных материалов – одна из актуальнейших проблем строительной отрасли в настоящее время. Первым шагом для решения этой проблемы является ее исследование, в том числе разработка доступных методов оценки биостойкости строительных материалов, изделий и конструкций.

В настоящее время оценка биостойкости материалов производится по ГОСТ 9.048-89, предполагающему 4 метода оценки. В качестве тест-организмов используется ряд микроорганизмов, поставляемых из Всероссийской Коллекции Микроорганизмов АН РФ: *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn, *Aspergillus niger* van Tieghem, *Aspergillus terreus* Thom, *Chaetom globosum* Kunze; *Paicicilomyces variotii* Bainier; *Penicillium funiculosum* Thom; *Penicillium chrysogenum* Thom; *Penicillium cyclopium* Westling; *Trichoderma viride* Pers. Ex. Fr. Суть стандартных методов заключается в заражении материалов суспензией вышеуказанных микроорганизмов и выдерживании в условиях, благоприятных для их развития в течение предписанного времени. Данные методы позволяют установить факт: является ли исследуемый материал фунгицидным, биостойким или небиостойким. Оценка устойчивости к воздействию микроорганизмов производится в баллах от 0 до 5. Однако, определить степень воздействия микроорганизмов на прочностные характеристики исследуемого материала затруднительно, ввиду необходимости обработки материала дезинфицирующим составом.

В этой связи нами в работе рассматривается возможность альтернативной (косвенной) оценки биостойкости строительных материалов, при их экспозиции в среде, моделирующей воздействие продуктов жизнедеятельности микроорганизмов [1-3]. Известно, что биологическому повреждению материалов способствуют не столько сами микроорганизмы, сколько продукты их метаболизма. Сильнейшими агрессивными метаболитами микроорганизмов являются органические кислоты, которые могут вызывать деструкцию различных материалов.

Известно, что из культур плесневых грибов различных родов [4] удалось выделить более 40 различных органических кислот. Необходимо отметить, что в наибольших количествах плесневые грибы образуют следующие кислоты: фумаровую, янтарную, яблочную, лимонную, глюконовую, молочную, щавелевую, уксусную.

Кратко рассмотрим основные органические кислоты – продукты метаболизма микроорганизмов, рассматривая их в порядке увеличения основности.

Уксусная кислота (одноосновная) является одним из главных промежуточных метаболитов, выделяемых плесневыми грибами различных родов, выполняющих как структурную, так и энергетическую функцию в обмене веществ.

К двухосновным кислотам относятся следующие: щавелевая, глюконовая, янтарная, яблочная и фумаровая.

Щавелевая кислота может накапливаться в культурах плесневых грибов в значительных количествах. Способность образовывать эту кислоту свойственна самым различным грибам. Наиболее подробно изучен синтез щавелевой кислоты в культурах плесневых грибов, принадлежащих к родам *Aspergillus*, *Mucor* и *Penicillium*. Характерной особенностью этого процесса является то, что щавелевая кислота образуется из самых разнообразных веществ: углеводов, пептона, глицерина, солей уксусной, винной, янтарной, фумаровой, лимонной, яблочной и других кислот. Весьма интенсивное образование щавелевой кислоты при культивировании плесеней на пептоне объясняется, по-видимому, накоплением в среде значительного количества аммиака. Щавелевая кислота – продукт неполного окисления сахара плесневыми грибами, поэтому может подвергаться дальнейшему окислению с образованием, в конечном итоге, диоксида углерода и воды.

Глюконовая кислота продуцируется многими видами микромицетов, среди которых особенно активны *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium glaucum*, *P. Purpurogenum* и *P. Cristaceum*. Глюконовая кислота широко применяется в фармацевтической промышленности и медицине. Поэтому процесс превращения глюкозы в глюконовую кислоту, происходящий под влиянием микроорганизмов, исследован довольно хорошо.

Янтарная кислота образуется большинством плесневых грибов, выращиваемых на средах, содержащих углеводы. Относительно большое ее накопление характерно для грибов родов *Fusarium*, *Rhizopus* и некоторых представителей родов *Penicillium* и *Aspergillus*.

Яблочная кислота выделена в небольших количествах из многих культур грибов, в которых она присутствует обычно в смеси с другими кислотами.

Фумаровая кислота обнаруживается у большинства грибов, усваивающих углеводы, ее накопление в больших количествах характерно для мукоровых грибов и особенно для грибов рода *Rhizopus*.

Стоит также отметить, что фумаровая, яблочная и янтарная кислоты могут взаимно превращаться друг в друга под влиянием плесневых грибов. Так, в культурах грибов *Rhizopus* или *Mucor*, образующих фумаровую кислоту, со временем последняя исчезает, а количество яблочной кислоты, накапливающейся в молодых культурах в небольшом количестве, постепенно возрастает. Обратимое превращение фумаровой кислоты в яблочную происходит под действием фермента фумаратгидратазы. Яблочная кислота легко синтезируется также в культурах *Aspergillus niger* из янтарной кислоты.

Лимонная кислота (трехосновная) является лучшим продуцентом *Aspergillus niger*, используемых для ее промышленного производства. Кроме того, значительное количество лимонной кислоты образуют *Aspergillus glaucus*, *A. Clavatus*, *A. Fumaricus*, *A. Awamori*, *A. Aureus*, *Penicillium glaucum*, *P. Arenarium* и др. Решающими факторами, от которых зависит накопление лимонной кислоты в культурах плесневых грибов, являются подходящий штамм гриба и достаточная аэрация культуры.

С учетом информации по кислотам, а также с учетом их химического строения для определения необходимой среды, моделирующей действие продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, нами выбрано по одному представителю кислоты каждого класса (одно-, двух- и трехосновных), являющихся наиболее распространенными метаболитами микроорганизмов: уксусная, щавелевая и лимонная. Мы полагаем, что испытания в такой среде позволят понять общую картину воздействия всех органических кислот на материалы.

Для моделирования воздействия метаболитов на образцы ЦПР нами выполнены исследования по определению уровня снижения прочностных характеристик (кубиковая прочность на сжатие) в средах с различным соотношением между компонентами среды (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние карбоновых кислот на прочностные характеристики**

Серия образцов	Кубиковая прочность на сжатие, $R_{сж}$ , МПа				
	Среда 1*	Среда 2	Среда 3	Среда 4	Среда №5
1	13,75	14,36	11,7	14,6	14,6
2	12,50	15,06	10,7	14,6	12,5
3	14,50	16,25	12,5	13,8	14,8

\*- состав сред описан в ранее опубликованной работе [3].

С целью подтверждения обоснованности выбранного состава модельной среды проведены исследования, заключающиеся в оценке воздействия микроорганизмов на прочностные характеристики (кубиковая прочность на сжатие  $R_{сж}$ ) материалов, выполненные совместно с кафедрой промышленной биотехнологии КНИТУ (КХТИ).

**Экспериментальная часть**

Объектами исследований являлись ассоциации сероокисляющих микроорганизмов EA2, EA3\*, выделенные Перушкиной Е.В. и Сироткиным А.С. из активного ила биологических очистных сооружений (БОС) ОАО «Казанский завод синтетического каучука» на питательных средах Бейеринка и Thio (таблица 2), и активный ил, отобранный с БОС «Казанский завод органического синтеза».

Активный ил опытная система (ОС-1) – это взвешенная в воде активная биомасса, осуществляющая процесс очистки сточных вод в аэротенках и являющаяся сложным сообществом микроорганизмов различных систематических групп и некоторых многоклеточных животных. По внешнему виду представляет собой хлопья светло-серого, желтоватого или темно-коричневого цвета, густо заселенные микроорганизмами, заключенными в слизистую массу. Средний размер хлопьев 1-4 мм, но в зависимости от условий в аэротенке он может изменяться от долей миллиметра до 30-40 мм.

Для оценки степени биологической коррозии бетонных материалов в процессе культивирования ассоциаций сероокисляющих микроорганизмов и активного ила использовались бетонные образцы из цементно-песчаного раствора (ЦПР) размером 80 см<sup>3</sup>.

Исследование биологической коррозии бетонных материалов в процессе культивирования ассоциаций микроорганизмов EA2 и EA3 на питательных средах производилось следующим образом.

Предварительно готовили стандартные среды Бейеринка и питательную среду для EA3 (Thio) согласно таблице 3. Питательные среды автоклавировали при 0,5 атм в течение 30 минут. Растворы  $Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$ ,  $NaHCO_3$ ,  $FeCl_3 \times 7H_2O$  автоклавировуют отдельно и вносят в стерильную питательную среду перед засевом микроорганизмов.

В опытных системах ОС2 и ОС3 (табл. 3) производили засев суспензии сероокисляющих микроорганизмов ассоциаций EA2 и EA3 в количестве 20 % от объема ПС. Затем в стерильных условиях в опытные системы вносили образцы бетона, стерилизованные в дистиллированной воде способом автоклавирования при избыточном давлении 1 атм.

Периодическое культивирование сероокисляющих микроорганизмов осуществляли на перемешивающем устройстве ( $n = 100$  об/мин (скорость 14)) при температуре культуральной жидкости 28 °С.

В процессе культивирования анализировали потребление основного субстрата – тиосульфата натрия, содержание сульфат – ионов, рост микроорганизмов по концентрации белка микробной биомассы и изменение рН среды с периодичностью отбора проб 2-3 суток. Отбор проб (7 см<sup>3</sup>) для аналитических исследований осуществляли в стерильных условиях.

Таблица 2

## Состав питательных сред (ПС) и сточных вод (СВ)

Название питательных сред	Состав питательной среды г/дм <sup>3</sup> дистиллированной воды	Назначение среды
Бейеринка	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ×5H <sub>2</sub> O* – 5; NaHCO <sub>3</sub> * – 1; NH <sub>4</sub> Cl – 0,1; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12H <sub>2</sub> O – 2; MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O – 0,1; FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O – следы	Для выделения сероокисляющих бактерий ЕА2
Thio	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ×5H <sub>2</sub> O* – 0,5; NH <sub>4</sub> Cl – 0,5; MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O – 0,1; CaCl <sub>2</sub> – 0,05; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,085; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,11; CH <sub>3</sub> COONa* – 0,5; Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ×5H <sub>2</sub> O – 0,5; FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O* (следы), ЭДТА (следы).	Для выделения сероокисляющих бактерий ЕА3
Сточная вода (конц.) ОАО «Казанский завод СК»	ХПК, не более 450000 мг/дм <sup>3</sup> Содержание взвешенных веществ, не более 350 мг/дм <sup>3</sup> Концентрация формала, не более 10 мг/дм <sup>3</sup> формальдегида, не более 40 мг/дм <sup>3</sup> общей серы, не более 25000 мг/дм <sup>3</sup> сульфатов, не более 100 мг/дм <sup>3</sup> сульфидов, не более 3000 мг/дм <sup>3</sup> рН, до 12,5	Для культивирования активного ила

\* – компоненты стерилизуются отдельно от ПС и вносятся в виде стерильных растворов перед засевом микроорганизмов.

Таблица 3

Характеристики опытных систем (ОС) в контейнерах для культивирования микроорганизмов объемом 1 дм<sup>3</sup>

Состав испытательных сред	ОС1	ОС2	ОС3
Питательна среда и СВ (для ОС 1), см <sup>3</sup>	200	230	230
Инокулят, см <sup>3</sup>	60	46	46

Для поддержания оптимальной концентрации восстановленных соединений серы в объеме питательной среды проводили дозирование раствора тиосульфата натрия после его полного окисления в ПС микроорганизмами. Например, при культивировании ассоциации ЕА2 добавляли раствор субстрата на 12 и 24 сутки культивирования.

Кроме того, вследствие длительности эксперимента (28 суток) производили периодическое культивирование микроорганизмов с дозированием новых порций питательных компонентов, не содержащих соединения серы (например, в случае испарения водной фазы в питательной среде).

Исследование биологической коррозии бетонных материалов в процессе культивирования сероокисляющих микроорганизмов активного ила на сточной воде осуществлялись следующим образом:

- В ОС1 с предварительно разбавленной в 100 раз сточной водой (200 см<sup>3</sup>) вносили суспензию активного ила в количестве 30 % от объема СВ и образцы бетона.
- Культивирование активного ила проводили в периодических условиях с подачей воздуха с помощью специального устройства – аэратора.
- Дозирование новой порции тиокольной СВ проводили через 1 сутки в количестве 100 см<sup>3</sup>.
- В процессе культивирования анализировали содержание сульфатов, изменение рН среды с периодичностью отбора проб 2-3 суток.

По окончании экспозиции исследуемые образцы ЦПР подвергали испытаниям на прочностные характеристики (кубиковая прочность на сжатие – R<sub>сж</sub>).

### Обсуждение результатов

Исследования биостойкости ЦПР в присутствии микроорганизмов позволили установить уровень снижения прочностных характеристик (табл. 4).

Таблица 4

#### Снижение кубиковой прочности на сжатие при воздействии микроорганизмов на образцы ЦПР

Серия образцов	Кубиковая прочность на сжатие, $R_{сж}$ , МПа		
	ОС1	ОС2	ОС3
1	12,50	10,00	9,58
2	12,08	8,75	9,58
3	10,00	9,58	8,75

Для оценки биостойкости строительных материалов наибольший интерес представляет среда ОС1 ввиду видового разнообразия микроорганизмов, содержащихся в активном иле. При сравнении результатов экспериментов по экспозиции образцов ЦПР в модельных (табл. 1) и испытательной ОС1 (табл. 2) средах, можно сделать вывод о том, что на прочностные характеристики исследуемого материала идентичное воздействие оказывает модельная среда из ранее выбранных органических кислот определенной концентрации и относительного содержания в смеси (табл. 5).

Таблица 5

#### Предлагаемый состав среды

Наименование компонента	Концентрация, %	Содержание в смеси,
Уксусная кислота	1 %	35 %
Щавелевая кислота	0,1 %	49 %
Лимонная кислота	1 %	16 %

Таким образом, в работе исследовано влияние одно-, двух- и трехосновных органических кислот (уксусная, щавелевая, лимонная) и их смесей, а также ассоциаций сероокисляющих бактерий и активного ила на прочностные характеристики ЦПР. Анализ полученных результатов позволил определить оптимальный состав среды, а также подтвердить ее моделирующее действие, аналогичное продуктам жизнедеятельности микроорганизмов.

### Список литературы

1. Stroganov V.F. Biodeterioration of polymers and polymer composite materials /V.F. Stroganov, D.A. Kukoleva, A.S. Akhmetshin, I.V. Stroganov // Polymer Science. Ser. D, 2009, vol. 2, number 3. – P. 164-166.
2. Stroganov V.F. Comparative analysis of methods investigating polymer biocorrosion processes / V.F. Stroganov, D.A. Kukoleva, A.S. Akhmetshin, I.V. Stroganov, I.G. Khabibullin // Polymer Science. Ser. D, 2009, vol. 2, number 3. – P. 167-169.
3. Строганов В.Ф., Куколева Д.А. Методика испытаний минеральных строительных материалов на биостойкость // Известия КГАСУ, 2011, № 3 (17). – С. 150-156.
4. Заикина Н.А. Образование органических кислот, выделяемых с объектов, пораженных биокоррозией / Н.А. Заикина, Н.В. Деранова // Микология и фитопатология, 1975, Т. 9, № 4. – С. 303-306.

**Stroganov V.F.** – doctor of chemical science, professor

E-mail: [svf08@mail.ru](mailto:svf08@mail.ru)

**Kukoleva D.A.** – assistant

E-mail: [daria-zd@rambler.ru](mailto:daria-zd@rambler.ru)

**Kazan State University of Architecture and Engineering**

The organization address: 420023, Kazan, Zelenaya st., 1

**Perushkina E.V.** – candidate of technical science, associate professor

**Kazan National Research Technological University**

The organization address: 420015, Kazan, K. Marks st., 68

**A comparative investigation of the influence  
of micro-organisms and environments modeling the waste products  
of microorganisms in the cement-sand grout**

**Resume**

The problem of biological damage (due to the action of various micro-organisms) of building constructions at the present time is relevant. This work is dedicated to providing methodological problems of biological corrosion of building materials, products and constructions. The standard method has several disadvantages, which do not permit to use it widely, so it became necessary to find alternative methods of testing building materials for biopersistence. It is known that the causes of biological destruction of building constructions are not the microorganisms, but their metabolic products. An assessment of the influence of strains sulfur-oxidizing bacteria and active sludge on the strength characteristics of cement-sand mortar. By the way, a lower level of strength characteristics of samples of cement-sand mortar, when exposed to a mixture of solutions of organic acids (acetic, oxalic and citric) was designated. Comparative analysis of the results has carried out, which allowed us to determine the composition of the model medium, with an impact on patterns of cement-sand grout, similar microorganisms in activated sludge. The model medium is a mixture of organic acids in the following proportions: acetic acid (1 %) – 2 parts by weight, oxalic acid (0,1 %) – 3 parts by weight, citric acid (1 %) – 1 mass part.

**Keywords:** biodeterioration, biocorrosion, active sludge, sulfur-oxidizing bacteria, cement-sand grout.

**References**

1. Stroganov V.F., Kukoleva D.A., Akhmetshin A.S., Stroganov I.V. Biodeterioration of polymers and polymer composite materials // Polymer Science. Ser. D, 2009, vol. 2, number 3. – P. 164-166.
2. Stroganov V.F., Kukoleva D.A., Akhmetshin A.S., Stroganov I.V., Khabibullin I.G. Comparative analysis of methods investigating polymer biocorrosion processes // Polymer Science. Ser. D, 2009, vol. 2, number 3. – P. 167-169.
3. Stroganov V.F., Kukoleva D.A. Method of test building materials on biodeterioration // News of the KSUAE, 2011, № 3 (17). – P. 150-156.
4. Zaikina N.A., Deranova N.V. The formation of organic acids, available from the sites affected by biocorrosion // Mikilodiya and fitopatologiya, 1975, V.9, № 4. – P. 303-306.