

УДК 561.28:544.772

Особенности регистрации спор грибов в воздушной среде с помощью счетчиков аэрозольных частиц

© 2019 П.А. АЛЕКСАНДРОВ¹, А.В. АЛЕКСАНДРОВА², Е.А. АНТОНОВ^{1,2}, М.И. ВЕСЕЛАЯ¹, В.И. КАЛЕЧИЦ^{1,*}, И.Е. КОВБАСЮК¹, Е.А. ЛАЩЕНОВА¹, О.Ю. МАСЛАКОВ¹, Е.С. ПРИТЧИНА¹, Е.С. ХОЗЯШЕВА¹, М.Н. ШАХОВ¹

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва 123182

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва 119991

*e-mail: Kalechits_VI@nrcki.ru, vik@clri.ru

Поступила в редакцию 19.10.2018 г.

После доработки 18.12.2018 г.

Принята к публикации 15.03.2019 г.

Продемонстрирована применимость лазерных счетчиков аэрозольных частиц для регистрации спор грибов в воздухе, в том числе в присутствии фоновых концентраций атмосферных аэрозольных частиц. Разработана методика, позволяющая перевести споры грибов диаметром от одного до нескольких десятков микрон во взвешенное в воздухе состояние. Регистрация с помощью счетчика аэрозольных частиц возможна в течение промежутков времени, достаточных для того, чтобы отследить перемещение спор на значительные (по сравнению с обычными пылевыми частицами) расстояния. По результатам измерений можно судить не только о наличии спор в воздушной среде, их размерах, количестве и путях перемещения, но и сделать предварительные выводы об их свойствах, в частности, о тенденции к склеиванию и образованию агрегатов. Возможность регистрации спор грибов в воздушной среде в реальном масштабе времени важна при контроле состояния систем кондиционирования, теплоснабжения и вентиляции любых объектов.

Ключевые слова: споры грибов, аэрозоль, распределение частиц по размерам, счетчик частиц аэрозолей.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-71-79

Лазерные счетчики частиц аэрозолей, определяющие функцию распределения по размерам и счетную концентрацию аэрозольных (взвешенных в воздухе) частиц, известны давно и широко применяются, прежде всего в технологии чистых производственных помещений [1], поскольку в них количество аэрозольных частиц определенных размеров нормативно ограничено¹. При этом контролируются, в основном, частицы субмикронных размеров, которые в обычных условиях в воздухе преобладают за счет броуновского движения [2]. Количество более крупных частиц (частиц, для которых седиментация преобладает над броуновским движением, что в обычных усло-

виях ($g = 9,8$ м/с) соответствует размерам более 1–3 мкм) обычно на порядки меньше, что объясняется, в первую очередь, их быстрым гравитационным осаждением.

Возможность использования лазерных счетчиков связана прежде всего с тем, что споры грибов не только имеют размеры, попадающие в диапазон измерений лазерных счетчиков аэрозолей, но и обладают плотностью и структурой поверхности, позволяющими им достаточно долго пребывать в аэрозольном состоянии. Эти свойства – прямое следствие того, что распространение по воздуху является одним из необходимых условий успешного выживания грибов в природе.

¹ГОСТ Р ИСО 14644-1:2017. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 1. Классификация чистоты воздуха по концентрации частиц. М.: Стандартинформ, 36.

Цель настоящей работы – эксперимент по использованию лазерных счетчиков аэрозольных частиц для детектирования и измерения параметров взвешенных в воздухе спор грибов и обоснование целесообразности их практического применения.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Методика

На начальной стадии работы отработывалась методика измерений, и были проведены измерения размеров спор грибов в обеспыленной среде. Схема экспериментального стенда показана на рис. 1.

Материал

Культуры грибов предварительно выращивали на питательной среде в чашках Петри диаметром 90 мм. Перед проведением каждого измерения камеру (1) (см. рис. 1) продували воздухом, очищенным с помощью абсолютного (мембранного) воздушного фильтра, не пропускающего частицы размером $>0,2$ мкм. Для измерений образец 2 (питательная среда с культурой гриба) помещали в герметичный объем камеры (1). Перед измерением камеру слегка встряхивали для отделения спор от спороносных структур и поднятия их над поверхностью колонии.

Для измерений был использован лазерный счетчик частиц аэрозолей Handheld 3016 (Lighthouse, США). Обобщенная оптическая схема ла-

зерного счетчика аэрозолей показана на рис. 2. Тонкая струя аэрозоля прокачивалась встроенным в прибор насосом через лазерный луч, причем диаметр струи и скорость пробоотбора подбирались таким образом, чтобы в луче находилось, как правило, не более одной аэрозольной частицы. Свет, рассеянный частицей, собирался оптической системой и зеркалом и направлялся на фотоприемное устройство. Световые импульсы преобразовывались фотоприемником в электрические импульсы, амплитуда которых была пропорциональна геометрическому размеру частиц, а количество – счетной концентрации.

Счетчик частиц Handheld 3016 регистрировал взвешенные в воздухе частицы с диаметром от 0,3 мкм. Весь диапазон измерений размеров частиц был разбит на шесть размерных поддиапазонов (каналов): 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0 мкм. В последнем канале подсчитывалось количество всех частиц размерами $>10,0$ мкм.

У счетчика частиц аэрозолей Handheld 3016 имелся встроенный насос, обеспечивающий пробоотбор и прокачивание воздуха камеры (1) (см. рис. 1) через прибор. Скорость отбора пробы воздуха была известна (2,8 л/мин), что позволяло путем простого арифметического действия, осуществляемого электронным блоком прибора без вмешательства оператора, определять значение счетной концентрации частиц. Результаты измерений для каждого поддиапазона размеров частиц отображались на дисплее прибора и могли быть переданы в компьютер для дальнейшей обработки.

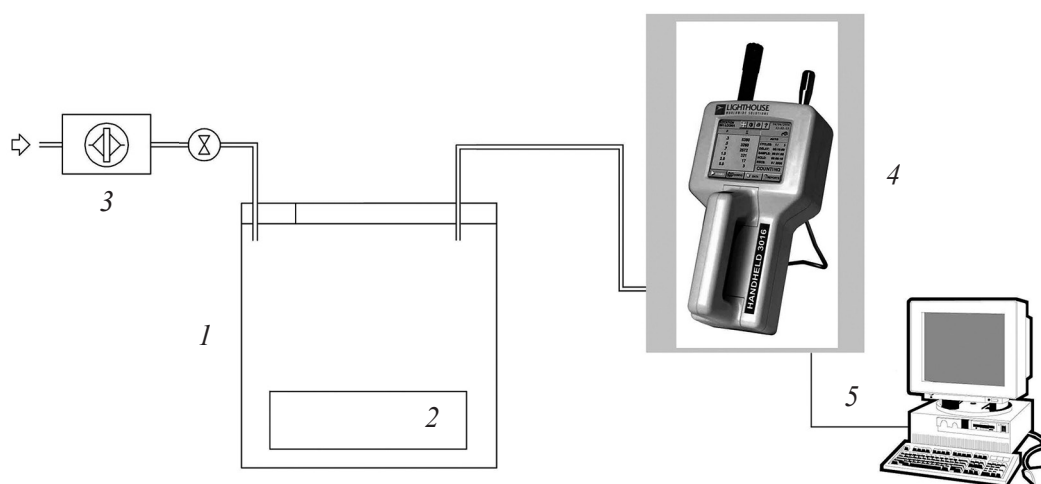


Рис. 1. Схема эксперимента по измерению размеров взвешенных в воздухе спор микроскопических грибов. 1 – герметичная камера с крышкой; 2 – образец культуры гриба; 3 – абсолютный воздушный фильтр 0,2 мкм; 4 – лазерный счетчик частиц аэрозолей Handheld 3016; 5 – компьютер

Fig. 1. The scheme of experiment on measurement of the sizes of airborne fungi spores, where 1 – hermetic chamber with a cover; 2 – sample of fungi colony; 3 – absolute air filter 0.2 microns; 4 – laser particles counter Handheld 3016; 5 – the computer

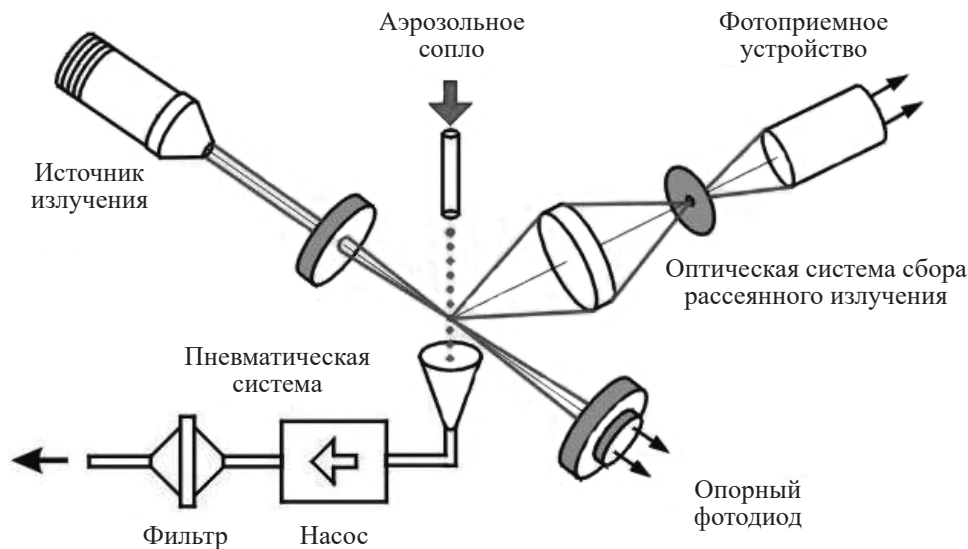


Рис. 2. Обобщенная оптическая схема лазерного счетчика отдельных аэрозольных частиц

Fig. 2. Typical optical scheme of the aerosol discrete-particles counter

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение взвешенных в воздухе спор

В первой серии экспериментов на установке (рис. 1) были проведены измерения взвешенных в воздухе спор пяти видов микроскопических грибов: *Trichoderma virens*, *Penicillioopsis clavariiformis*, *Ulocladium botrytis*, *Penicillium chrysogenum*, *Beauveria bassiana*. Каждое измерение длилось 1 мин. За это время прибор отбирал и анализировал пробу объемом 2,8 л. Всего было проведено 78 измерений.

Результаты измерений для трех видов грибов (функции распределения спор по размерам) показаны на рис. 3.

Максимум функции распределения должен соответствовать размеру (диаметру) спор. В табл. 1 приведены размеры спор указанных грибов, полученные в ходе микроскопических измерений. Важно отметить, что разрешения счетчика частиц по размерам не хватает для более точной идентификации грибов.

На рис. 4 приведен пример микроскопического исследования размеров спор.

Метод импульсного воздействия на колонию грибов

Размеры спор грибов *Trichoderma virens* и *Ulocladium botrytis* в первой серии экспериментов измерить не удалось: функции распределения по размерам не имели выраженного максимума, при-

чем частицы (споры) размером > 3 мкм практически не регистрировались. Поскольку известно, что размеры спор этих грибов довольно велики (средний размер для *Ulocladium botrytis* – 22 мкм, а *Trichoderma virens* формирует клейкие споры, собирающиеся в агрегаты размером ≈ 17 мкм), было очевидно, что споры не удалось поднять в воздух.

Для решения этой проблемы был разработан метод импульсного воздействия на колонию грибов. Во второй серии экспериментов условия измерения были максимально приближены к реальным. Чашка Петри с колонией грибов размещалась не в обеспыленной камере, а на поверхности лабораторного стола, в условиях «стандартной» воздушной среды лабораторного помещения.

В ходе измерений на чашку Петри с колонией грибов *Penicillioopsis clavariiformis* направляли либо постоянный поток воздуха от небольшого вентилятора (диаметр крыльчатки 8 см), либо импульсную струю воздуха из медицинской спринцовки (груша). Пробоотборник счетчика частиц располагался либо непосредственно около чашки Петри, либо на расстоянии 1,2 м или 2 м от нее. Сам счетчик частиц во время проведения эксперимента был включен постоянно и производил измерения каждую минуту.

Результаты измерений счетной концентрации частиц в различных диапазонах размеров при постоянном (вентилятор) и импульсном (груша) воздействии струей воздуха на колонию грибов показаны на рис. 5.

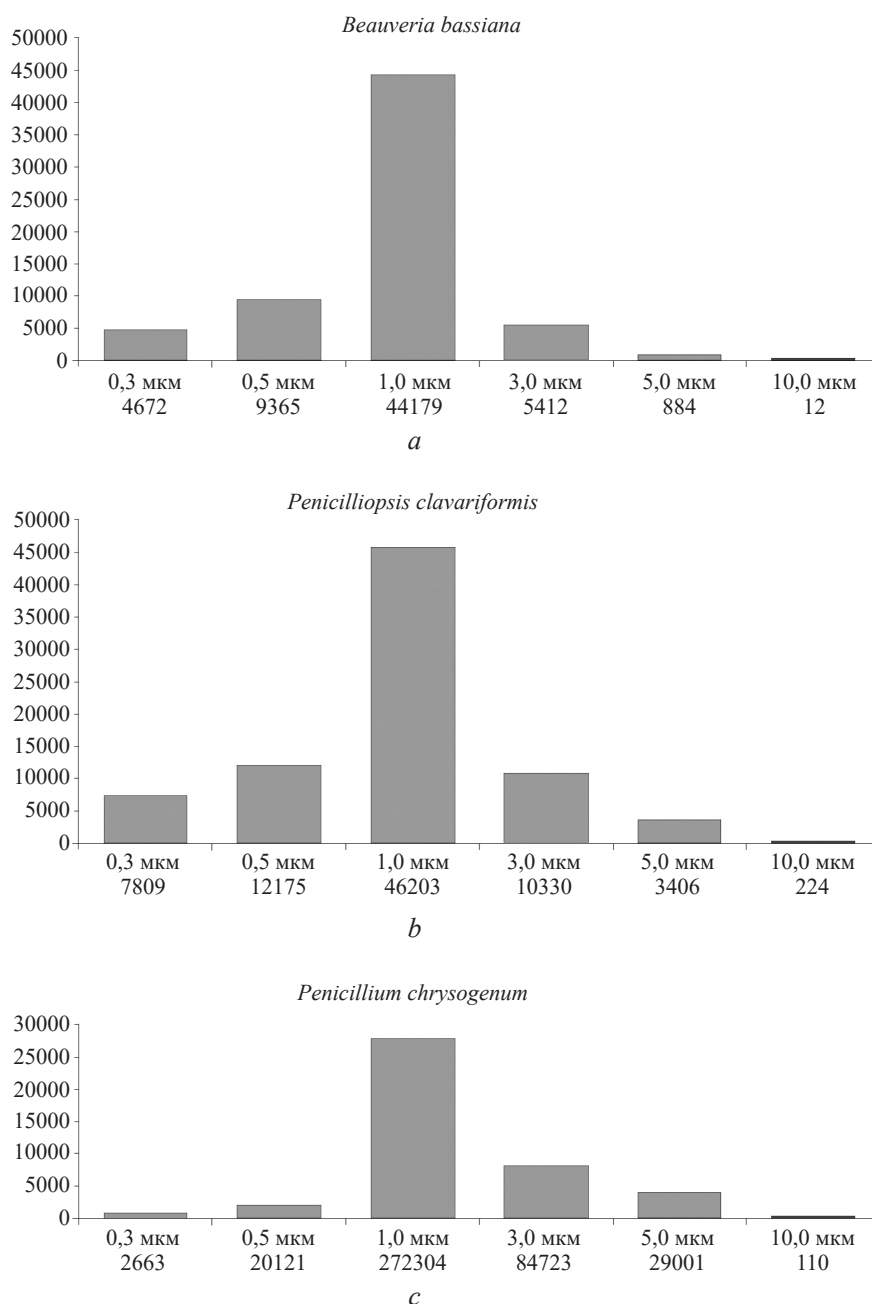


Рис. 3. Функция распределения по размерам спор гриба *Beauveria bassiana* (a) *Penicillioptis clavariformis* (b), *Penicillium chrysogenum* (c). Шаги гистограммы: 0,3–0,5 мкм; 0,5–1,0 мкм; 1,0–3,0 мкм; 3,0–5,0 мкм; 5,0–10,0 мкм; все частицы >10,0 мкм. На оси ординат – количество зарегистрированных частиц данного диапазона размеров в пробе

Fig. 3. The size distribution of *Beauveria bassiana* (a) *Penicillioptis clavariformis* (b), *Penicillium chrysogenum* (c) spores. The histogram’s size ranges: 0.3–0.5 μm; 0.5–1 μm, 1.0–3.0 mkm; 3.0–5.0 μm; 5.0–10.0 μm; all particles over 10.0 μm. The ordinate axis shows the number of registered particles of present size range

Таблица 1

Размеры (мкм) трех видов грибов, полученные с помощью оптического микроскопа

Measured sizes of fungi spores (μm)

Вид	Минимум	Среднее	Максимум	Форма
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2,16	3,06	4,22	Сферические
<i>Beauveria bassiana</i>	1,61	2,46	3,89	Яйцевидные
<i>Penicillioptis clavariformis</i>	7,00	10,00	13,80	Эллиптические

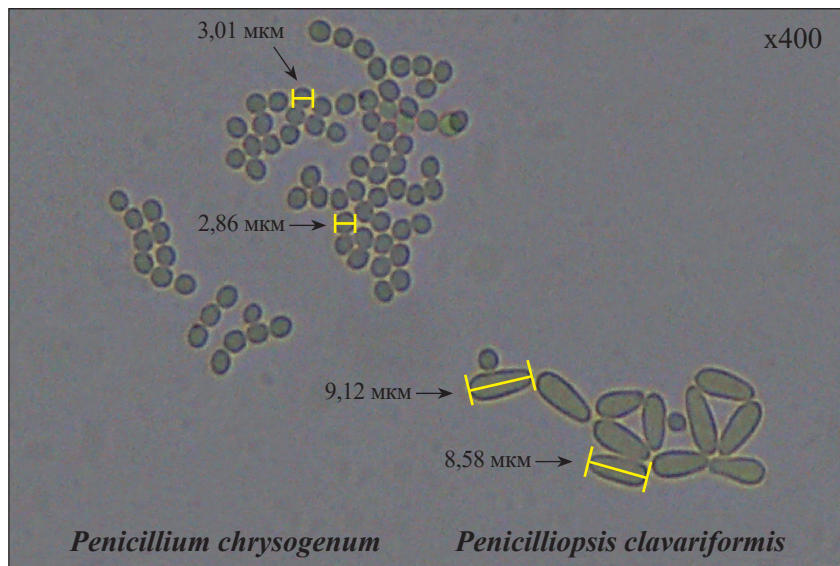


Рис. 4. Пример измерения размеров спор грибов *Penicillium chrysogenum* и *Penicillium clavariformis* с помощью изображения, создаваемого оптическим микроскопом

Fig. 4. An example of spores' size measurement of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium clavariformis* using an image created by an optical microscope

Из рис. 5 хорошо видно, что в диапазоне размеров до 1 мкм при всех видах воздействия никакие изменения счетной концентрации не регистрировались. При направлении на чашку Петри постоянного потока воздуха от вентилятора (6-я мин эксперимента на рис. 5) концентрации круп-

ных (>1,0 мкм) частиц возросла в несколько раз. Зато при комбинированном воздействии на колонию грибов постоянного и импульсного потоков воздуха (9-я мин на рис. 5) счетная концентрация крупных частиц возросла на порядок, а для частиц с размером более 10 мкм – на два порядка.

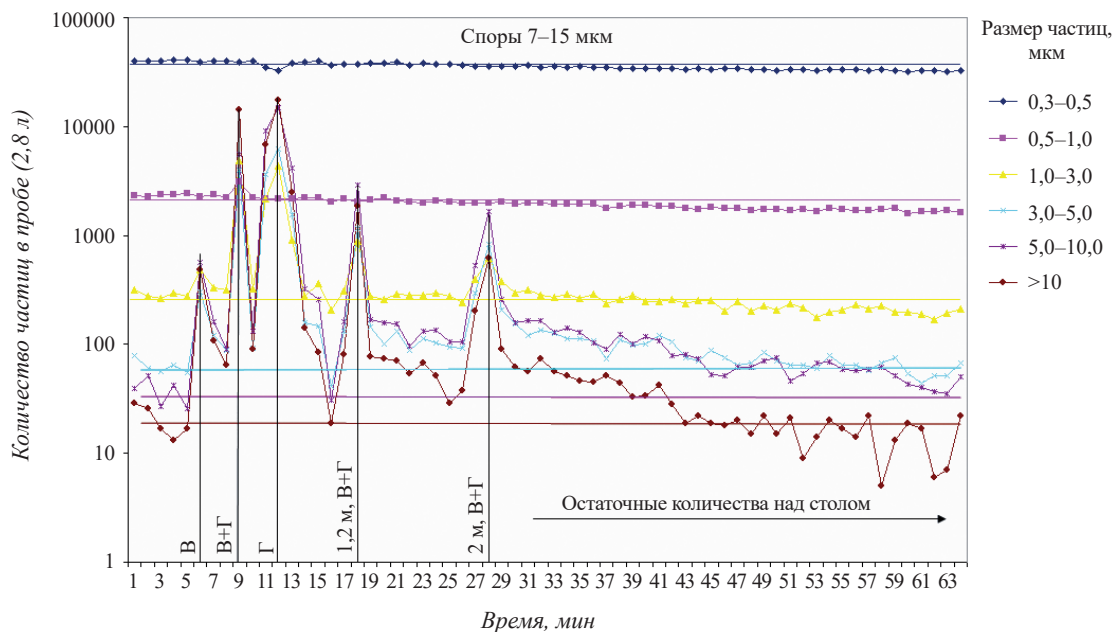


Рис. 5. Результаты измерений счетной концентрации частиц *Penicillium clavariformis* при постоянном и импульсном воздействии струей воздуха на колонию грибов. В – вентилятор; Г – груша; 1,2 м и 2 м – указано расстояние от пробоотборника счетчика частиц до чашки Петри

Fig. 5. Measurement of the number concentration of particles of *Penicillium clavariformis* under constant and pulsed action of the air jet on the colony of fungi. Designations: В – working fan; Г – syringing; 1,2 м and 2 м – distance from Petri dish to sampling probe

То, что это возрастание связано именно с импульсным воздействием, доказывают измерения на 12-й минуте, когда вентилятор был временно выключен.

Измерений счетной концентрации частиц при комбинированном воздействии на колонию грибов постоянного и импульсного потоков воздуха были повторены на 18-й и 28-й минутах, причем пробоотборник счетчика частиц располагался на расстоянии 1,2 м и 2 м от чашки Петри, соответственно. В обоих случаях регистрировалось увеличение счетной концентрации крупных частиц на порядок.

Необходимо заметить, что после окончания всех воздействий на колонию грибов концентрация наиболее крупных (>5,0 мкм) частиц в воздухе помещения вернулась к среднестатистическим (для данного помещения) значениям только через 30 мин.

Диаметр спор грибов *Penicillium claviformis*, измеренный оптическим микроскопом, лежит в диапазоне 7–15 мкм. Частицы таких размеров практически не встречаются в атмосферном воздухе из-за большой скорости седиментации (~1 см/с), но эта величина рассчитана исходя из плотности 1 г/см³. Споры же грибов имеют значительно меньшую плотность за счет своей сложной структуры. Это позволяет им намного дольше

находиться в воздухе во взвешенном состоянии, чем частицам обычной атмосферной пыли аналогичного размера.

Таким образом, споры микроскопических грибов, имеющие относительно крупные (>5 мкм) размеры, уверенно регистрируются в воздухе после воздействия на колонию грибов импульсным потоком воздуха.

Чувствительность метода

Наконец, еще один эксперимент был проведен с целью демонстрации чувствительности метода при многократном разбавлении воздуха.

В центре лабораторного помещения на столе размещали чашку Петри с колонией грибов *Penicillium chrysogenum*. Площадь помещения, в котором проводились исследования, составляла 60 м² (6×10 м), высота потолка 3,5 м, работала приточная вентиляция. Спектр размеров аэрозолей в помещении в основном (концентрация, характер функции распределения) соответствовал типичному лабораторному помещению. Точка отбора пробы находилась в месте выхода воздушного потока из помещения. Таким образом, моделировался мониторинг суммарного воздушного потока из помещения.

На рис. 6 показаны результаты измерений счетной концентрации частиц в потоке воздуха, выходящем из помещения через вытяжную

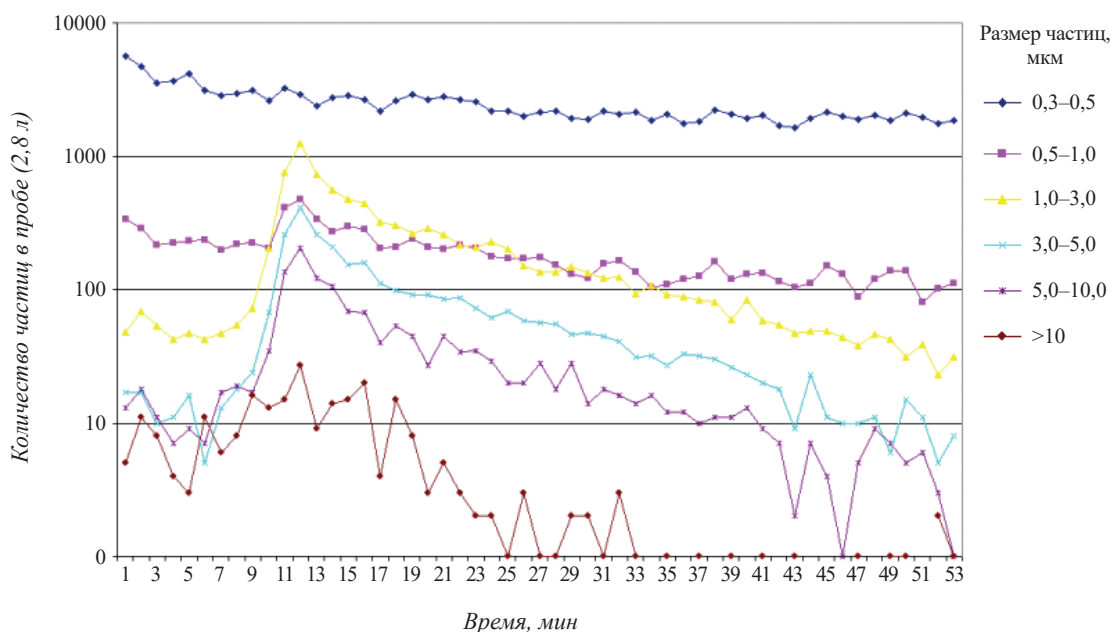


Рис. 6. Результаты измерений счетной концентрации частиц *Penicillium chrysogenum* в потоке воздуха, выходящем из помещения через вытяжную решетку после однократного импульсного воздействия струей воздуха на колонию грибов

Fig. 6. Measurements of the number concentration of particles of *Penicillium chrysogenum* in the airflow leaving the room through the exhaust grille after a single pulse impact of the air jet on the colony of fungi

решетку, после однократного (в момент времени 0) импульсного воздействия струей воздуха на колонию грибов.

Первоначально изменений концентрации зарегистрировано не было, однако, примерно с 8-й мин количество частиц почти во всех диапазонах размеров (кроме частиц 0,3–0,5 мкм) стало возрастать. Особенно заметный рост концентрации (на порядок) для частиц в диапазоне размеров 1,0–10,0 мкм наблюдался на 12–13-й мин с начала измерений.

Анализируя зависимости на рис. 6, можно отметить, что даже в условиях значительного разбавления генерируемых частиц в воздушном объеме помещения удалось очень быстро (начиная с 8-й минуты после воздействия на грибы) зафиксировать существенный (на порядок) рост концентрации крупных аэрозольных частиц, причем возвращение к средним значениям в этом диапазоне размеров наступило только спустя примерно 30 мин после регистрации максимума концентрации.

Таким образом, в ходе предварительных экспериментов удалось продемонстрировать применимость лазерных счетчиков аэрозольных частиц для регистрации спор микроскопических грибов во взвешенном в воздухе состоянии, в том числе в присутствии фоновых концентраций атмосферных аэрозольных частиц, а также разработать методику, позволяющую перевести во взвешенное в воздухе состояние крупные (диаметром от одного до нескольких десятков микрон) споры грибов, и уверенно их регистрировать в присутствии фоновых концентраций атмосферных аэрозольных частиц.

Тем не менее стало очевидно, что шести размерных поддиапазонов стандартного счетчика аэрозольных частиц недостаточно для удовлетворительного измерения функции распределения спор грибов по размерам, особенно в области крупных частиц. Поэтому следующей задачей стало повышение разрешения по размерам счетчика частиц аэрозолей, что позволило бы со значительно большей точностью измерять размер взвешенных в воздухе спор микроскопических грибов и идентифицировать их виды.

Измерение функции распределения по размерам взвешенных в воздухе спор грибов с разрешением, обеспечивающим их идентификацию

Поставленную задачу удалось решить, подключив к счетчику частиц многоканальный анализатор оптических импульсов АМРТЕК

МСА 8000А (США). Количество каналов (400) оказалось даже чрезмерно большим для поставленной задачи построения функции распределения спор по размерам с шагом 0,5 мкм, и поэтому результаты измерений МСА 8000А дополнительно обрабатывали в программе Excel.

На рис. 7 показаны примеры измерений функции распределения спор по размерам. В отличие от предварительных экспериментов (рис. 1), измерительную камеру не герметизировали и подаваемый в нее воздух не обеспыливали. Поэтому предварительно был измерен уровень фоновой запыленности воздуха, который в дальнейшем вычитался из результатов измерений. Следует отметить, что фоновое содержание аэрозолей в воздухе в рассматриваемом диапазоне размеров частиц было очень низким – доли процента от общего числа (десятки частиц диаметром 1–2 мкм и единицы частиц с размерами >2 мкм).

На рис. 7а функция распределения имеет четко выраженный максимум; разброс по размерам небольшой, уширение и особенности функции распределения отсутствуют. Эти факты можно связать с тем, что споры *Talaromyces aculeatus* имеют сферическую или очень близкую к сферической форму с небольшим разбросом размеров, однородны и не обладают тенденцией к склеиванию [3].

Функция распределения по размерам спор *Aspergillus niger* (рис. 7б) имеет более сложный вид. Максимум распределения выражен в диапазоне (2,5 ± 0,5) мкм достаточно четко, что совпадает с данными литературы о размерах спор [4], однако большое количество частиц зафиксировано в диапазоне размеров правее максимума (>1,5 мкм). Такая форма функции распределения характерна для аэродисперсных систем из частиц одного размера, но содержащих большое количество агрегатов из двух, трех и т.д. частиц, что, по-видимому, и зафиксировано в данном случае.

Таким образом, в серии экспериментов показана возможность использования лазерных счетчиков аэрозольных частиц для детектирования и измерения функции распределения по размерам взвешенных в воздухе спор грибов с разрешением, обеспечивающим их идентификацию. Несмотря на относительно крупные размеры спор, их регистрация с помощью счетчика аэрозольных частиц возможна в течение промежутков времени, достаточных для того, чтобы отследить перемещение спор на значительные (по сравнению с обычными пылевыми частицами) расстояния. При этом по результатам измерений можно

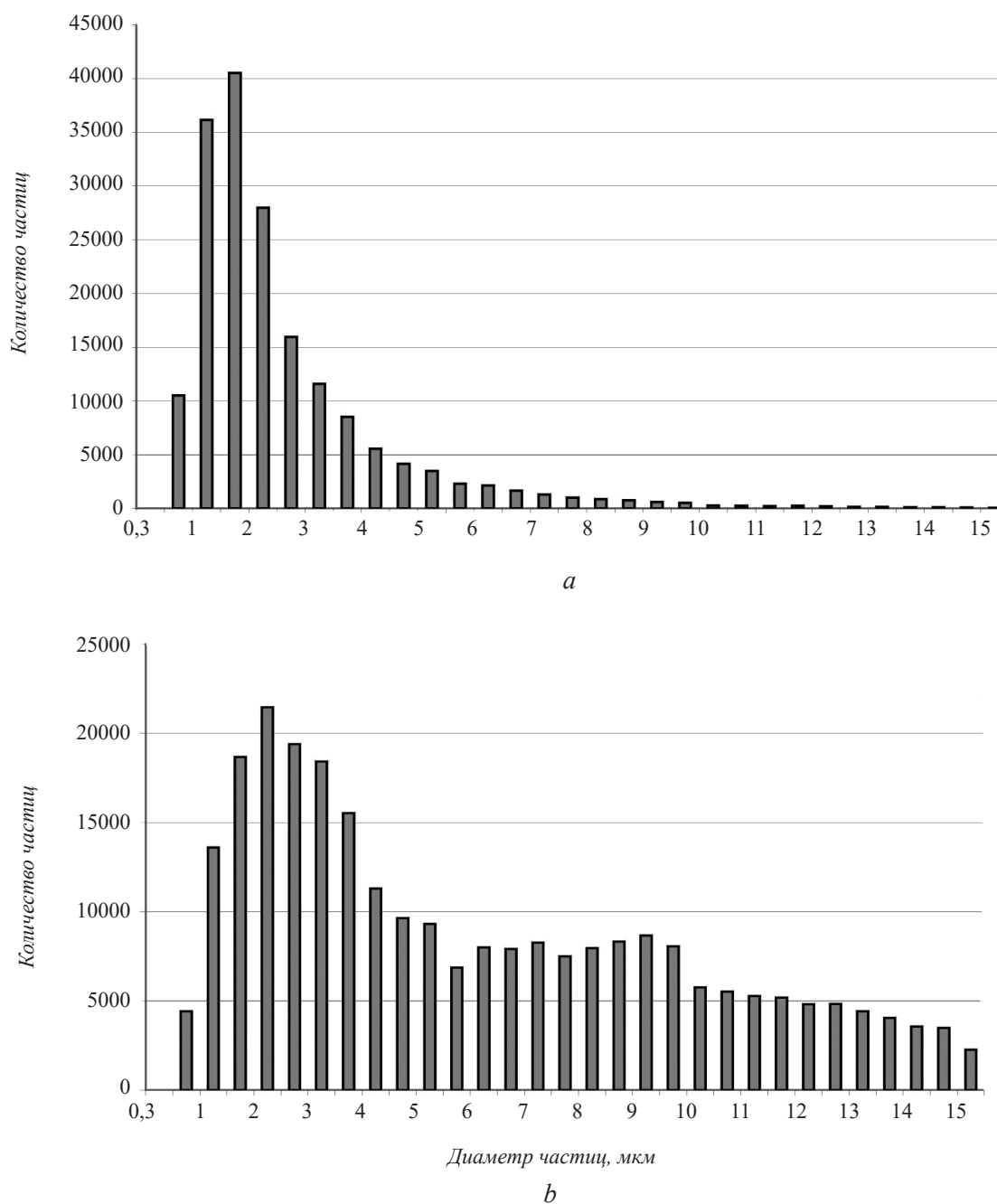


Рис. 7. Функция распределения по размерам взвешенных в воздухе спор гриба *Talaromyces aculeatus* (a), *Aspergillus niger* (b). Шаг гистограммы по оси абсцисс 0,5 мкм. По оси ординат отложено количество частиц данного диапазона размеров в пробе. Максимумы распределения для размера $1,5 \pm 0,5$ мкм (a) и $2,5 \pm 0,5$ мкм (b)

Fig. 7. The size distribution of airborne spores of *Talaromyces aculeatus* (a) and *Aspergillus niger* (b). The histogram's size range corresponds to 0,5 μm. The ordinate axis shows the number of particles of of current size range. Maximum of size distribution corresponds (a), to $1,5 \pm 0,5$ μm and (b), to $2,5 \pm 0,5$ μm

судить не только о наличии спор в воздушной среде, их размерах, количестве и путях перемещения, но и сделать некоторые предварительные выводы об их свойствах, в частности, о тенденции к склеиванию и образованию агрегатов.

Возможность регистрации наличия спор грибов в воздушной среде в реальном масштабе вре-

мени, в том числе с их идентификацией, может сыграть важную роль при контроле состояния систем кондиционирования, теплоснабжения и вентиляции (HVAC-системы), в которых, как известно, часто создаются комфортные условия (тепло, влага) для развития и роста колоний микроорганизмов, в том числе грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уайт В. Технология чистых помещений. Основы проектирования, испытаний и эксплуатации [Перевод с англ. под ред. В.И. Калечица]. М.: Изд-во Клирум, 2002, 304.
2. Батчер С., Чарлсон Р. Введение в химию атмосферы. М.: Мир, 1977, 270.
3. Yilmaz N., Visagie C.M., Houbraeken J., Frisvad J. C., Samson R.A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies Mycology*, 2014, 78, 175–341.
4. Broderickand A.J., Greenshields R.N. Sporulation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus* in Continuous Submerged Liquid Culture. *J. General Microbiology*, 1981, 126, 193–202.

Peculiarities of Registration of Fungi Spores in the Air with the Help of Aerosol Particles Counters

P.A. ALEKSANDROV¹, A.V. ALEKSANDROVA², E.A. ANTONOV^{1,2}, M.I. VESELAYA¹, V.I. KALECHITS^{1,*}, I.E. KOVBASYUK¹, E.A. LASHCHENOVA¹, O.Yu. MASLAKOV¹, E.S. PRITCHINA¹, E.S. KHOZYASHEVA¹, M.N. SHAKHOV¹

¹National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, 123182 Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: Kalechits_VI@nrcki.ru, vik@clri.ru

Received October 19, 2018

Revised December 18, 2018

Accepted March 15, 2019

The applicability of laser aerosol particle counters for the registration of microscopic fungal spores in the airborne state (including in the presence of background concentrations of atmospheric airborne particles) was demonstrated during the experiments, and a technique was developed to transfer large (from one to several tens of microns in diameter) fungal spores to the air-suspended state, and to register them confidently with a resolution ensuring their identification. Despite the relatively large size of spores, their detection by the aerosol particle counter is possible for a period of time sufficient to track the movement of spores over significant (compared to conventional dust particles) distances. At the same time, according to the results of measurements, it is possible to judge not only the presence of spores in the air, their size, quantity and ways of movement, but also to draw some preliminary conclusions about their properties, in particular, about the tendency to glue and form aggregates.

Key words: fungal spores, aerosol, particle size distribution, aerosol particle counter.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-71-79