

УДК 579.66

## ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ АНТИМИКОТИКОВ И ОЦЕНКИ ГРИБОСТОЙКОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ

© 2022 г. Ю. А. Рыбаков<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

<sup>2</sup>НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

\*e-mail: yrybakov@genetika.ru

Поступила в редакцию 26.09.2022 г.

После доработки 17.10.2022 г.

Принята к публикации 20.10.2022 г.

В представленном обзоре описаны основные культуры микромицетов, включенные в российские и международные стандарты и используемые для тестирования качества питательных сред, оценки противогрибных препаратов и испытаний промышленных материалов на грибостойкость.

**Ключевые слова:** микромицеты, антимикотики, грибостойкость

**DOI:** 10.56304/S0234275822060114

Важным элементом обеспечения качества и надежности микробиологических исследований является применение референтных, или тестовых, штаммов или тест-культур. Штаммы микроорганизмов, предлагаемые в качестве образца сравнения для различных диагностических и экспертных исследований (определение качества питательных сред, характеристики и эффективности препаратов, подтверждение правильности и стандартизации), обладают комплексом признаков, позволяющих рекомендовать их для использования в тех или иных процедурах контроля в качестве микробиологических стандартов. Тест-культуры представляют собой сертифицированный и валидированный биологический материал, указанный в методических или нормативных документах, поддерживаемый в коллекциях микроорганизмов, что гарантирует его подлинность и сохранение свойств, при предоставлении пользователям.

Обширную группу референтных культур микроорганизмов составляют тест-штаммы микромицетов. Они представлены преимущественно Дейтеромицетами, хотя в состав группы входят и Аско-

мицеты (*Chaetomium globosum*), и Зигомицеты (*Mucor racemosus*).

Тест-штаммы микромицетов используются, наряду с бактериальными и дрожжевыми культурами, для определения ростовых свойств питательных сред, для испытания биостойкости материалов и изделий, оценки активности препаратов синтетических и природных фунгицидов и эффективности методов защиты различных объектов от биоповреждений.

Большинство грибных тест-культур относятся к 1-му уровню биологического риска (BSL 1), соответствующему IV группе патогенности СанПиН 1.2.3685-21 [27], только некоторые штаммы *Aspergillus fumigatus* и *A. flavus*, используемые для оценки противогрибных антибиотиков и фунгицидов, принадлежат к BSL 2 (III группа патогенности).

Самые распространенные и широко используемые тест-штаммы грибов представлены в табл. 1.

В России наиболее полным набором сертифицированных тест-культур микромицетов обладает Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (ИБФМ РАН), занимающегося их распространением заинтересованным организациям, поэтому в российских нормативных документах они указаны под номерами ВКМ [24]. В то же время целый ряд штаммов поддерживается и в других российских коллекци-

*Список сокращений:* BSL (Biosafety Level) – уровень биобезопасности, WDCM (World Data Centre for Microorganisms) – Всемирный центр данных по микроорганизмам, WFCC (World Federation for Culture Collections) – Всемирная федерация коллекций культур, ICFMH (International Committee on Food Microbiology and Hygiene) – Международный комитет по пищевой микробиологии и гигиене.

**Таблица 1.** Тест-штаммы микромицетов, используемых для оценки качества сред, активности фунгицидов и грибоустойкости материалов  
**Table 1.** Most frequent test-strains of microfungi used to assess media quality, fungicide activity and fungal resistance of materials

| Тест-культура  | Номер штамма в коллекциях   | Уровень безопасности | Повреждаемые материалы/тест   | Нормативный документ      |
|--|---|----------------------|---|---------------------------|
| <i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler   | ATCC 66981; CBS 916.96; IMI 254138; EGS 34-016  | BSL 1                | Краски; лаки  | [11]                      |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> Varga et al.*  | ATCC 9642; CBS 246.65; NRRL 3536; NRRL A-5243; DSM 63263; IFO 6342; IMI 91855; QM 386; SN 26; VKM F-1119; VKPM F-824  | BSL 1                | Авиационные детали; консерванты древесины; электрическое и электронное оборудование   | [2, 4, 15, 31, 33, 35]    |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i> Varga et al.*  | ATCC 16404; CBS 733.88; DSM 1387; DSM 1988; IFO 9455; IMI 149007; VKM F-3882 VKPM F-879; WDCM 00053   | BSL 1                | Контроль качества питательных сред; тест на стерильность питательных сред, валидация методов стерилизации; тестирование дезинфицирующих средств, фунгицидов и консервантов  | [7, 16, 20, 25]           |
| <i>Aspergillus flavus</i> Link*  | ATCC 9643; CBS 131.61; DSM 1959; IFO 6343; IMI 91856; NRRL A-5244; NRRL 3537; QM 380; RIB 1403; SN 3; VKPM F-895  | BSL 1                | Авиационные детали и трансмиссии; автомобильные детали и узлы; воск; изоляционные материалы; клеи; консерванты древесины; лаки; пластмассы; паранитрофенол; пробка; упаковочные материалы; электрическое и электронное оборудование | [35, 40]                  |
| <i>Aspergillus flavus</i> Link*  | ATCC 204304   | BSL 2                | Тест на чувствительность к противогрибковым препаратам  | [40, 41]                  |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius   | ATCC MYA-3626   | BSL 2                | Тест на чувствительность к противогрибковым препаратам  | [40]                      |
| <i>Aspergillus niger</i> Tieghem*  | ATCC 6275; CBS 131.52; NRRL 334; DSM 1957; CBS 769.97; CBS 131.52; CCRC 32073; CECT 2807; IFO 6341; NCIM 596; NCIM 773; QM 324; QM 458; VTT D-81078; VKM F-2039; VKPM F-894; WDCM 00144 | BSL 1                | Авиационные детали и трансмиссии; застывшая грунтовка; изделия из кожи; клей для винила на водной основе; краски; лаки; пластик; текстиль; упаковочные материалы, бумага и картон   | [5, 9–11, 13, 18, 42, 46] |
| <i>Aspergillus restrictus</i> Smith<br>(в наст. время — <i>Aspergillus caesiellus</i> Saito) | ATCC 42693; CECT 20807; FRR 2176; WDCM 00183  | BSL 1                | Тест на обсемененность сухих продуктов и кормов   | [16, 45]                  |

Таблица 1. Продолжение

| Тест-культура  | Номер штамма в коллекциях   | Уровень безопасности | Повреждаемые материалы/тест   | Нормативный документ |
|--|---|----------------------|---|----------------------|
| <i>Aspergillus terreus</i> var. <i>aureus</i> Thom et Raper  | ATCC 16793; NRRL 1923; CBS 503.65; QM 7472; IMI 82431; WB 1923; VKM F-2035  | BSL 1                | Клеи; оптика; пластмассы; резина  | [5, 9, 10]           |
| <i>Aspergillus terreus</i> Thom (в наст. время в ATCC – <i>Aspergillus alabamensis</i> Balajee et al.)                 | ATCC MYA-3633   | BSL 1                | Тест на чувствительность к противогрибковым препаратам  | [40]                 |
| <i>Aspergillus versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi *   | ATCC 11730; ATCC 16020; CBS 245.65; DSM 1943; DSM 63301; VKM F-1114   | BSL 1                | Бортовое оборудование самолетов; детали автомобилей; клеи; электрическое и электронное оборудование   | [3, 18]              |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud  | ATCC 9348; CBS 621.80; DSM 2404; IMI 145194; QM 3090; VKM F-1116; VKPM F-891  | BSL 1                | Краски; лаки; пластмасса; полимерные материалы<br>контроль роста микроорганизмов в климатической камере   | [5, 9, 18, 34, 37]   |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanigenum</i> Hermanides-Nijhof   | ATCC 15233; CBS 249.65; IMI 45533; QM 279c; VKM F-3110  | BSL 1                | Клеящие вещества; краски; полимеры  | [33]                 |
| <i>Chaetomium globosum</i> Kunze:Fries*  | ATCC 6205; CBS 148.51; NRRL 1870; DSM 1962; IFO 6347; IMI 45550; MUCLE 1984; QM 459; USDA 1042.4; VTT D-81079; VKPM F-323 | BSL 1                | Авиационные и автомобильные детали и трансмиссии; клеящие материалы; полимерные материалы; текстиль; упаковочные материалы, бумага и картон; электрическое и электронное оборудование | [10, 13, 31, 35, 46] |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresenius) de Vries   | ATCC 11277; CBS 109.21; IFO 6368; IMI 049625; CECT 20805; NBRC 6348; NBRC 6368; WDCM 00190                                | BSL 1                | Текстиль  | [43]                 |
| <i>Cladosporium resinae</i> (Lindau) de Vries (в наст. время – <i>Hormoconis resinae</i> (Lindau) von Arx et de Vries) | ATCC 20495; CBS 174.61; NRRL 6437; QM 7998  | BSL 1                | Дизельное топливо   | [8, 36]              |
| <i>Eurotium rubrum</i> Konig et al.  | ATCC 42690; CECT 20808; FRR 1968; WDCM 00184  | BSL 1                | Тест на обсемененность сухих продуктов и кормов   | [45]                 |

Таблица 1. Продолжение

| Тест-культура   | Номер штамма в коллекциях   | Уровень безопасности | Повреждаемые материалы/тест   | Нормативный документ            |
|---|---|----------------------|---|---------------------------------|
| <i>Gibberella fujikuroi</i> (Sawada) Wol-Ienweber<br>( <i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon)                                       | ATCC 12616; CBS 183.29; DSM 893;<br>IMI 58290; VKM F-136  | BSL 1                | Краски; лаки  | [11]                            |
| <i>Miscor racemosus</i> Fresenius   | ATCC 42647; NRRL 6341; CECT 20821;<br>WDCM 00181  | BSL 1                | Контроль качества питательных сред;<br>тест на обсемененность влажных продуктов<br>и кормов | [16, 44]                        |
| <i>Myrothecium verrucaria</i> (Albertini et Schweinitz) Ditmar : Fries  | ATCC 9095; CBS 328.52; NRRL 2003;<br>DSM 2087; CCRC 31545; IFO 6113;<br>IMI 45541; QM 460; USDA 1334                                    | BSL 1                | Авиационные детали и трансмиссии;<br>текстиль   | [29]                            |
| <i>Raecilomyces variotii</i> Bainier<br>(в наст. время – <i>Byssoschlamys spectabilis</i> (Udagawa et Suzuki) Houbraken et Samson | ATCC 10121; ATCC 18502; CBS 284.48;<br>NRRL 1115; DSM 1961; IMI 40025;<br>IAM 5001; QM 6764; NBRC 100534;<br>VTT D-83214;<br>VKPM F-978 | BSL 1                | Кожа; пластики; текстиль  | 15, 9, 10, 12, 18,<br>46]       |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> Thom   | ATCC 10106; NRRL 807; CBS 306.48;<br>IMI 24314; QM 7500; VKPM F-1310  | BSL 1                | Краски; лаки; технические масла и смазки  | [11–13]                         |
| <i>Penicillium citrinum</i> Thom*   | ATCC 9849; NRRL 756; CBS 342.61;<br>IFO 6352; IMI 321326;<br>IMI 61272; JCM 22601; VKPM F-321,<br>WDCM 00189                            | BSL 1                | Детали автомобилей; краски  | [37, 43]                        |
| <i>Penicillium funiculosum</i> Thom<br>(в наст. время – <i>Talaromyces pinophilus</i> (Hedgcock) Samson et al.)                   | ATCC 11797; NRRL A-622;<br>NRRL A-1616; NRRL 3647; DSM 10640;<br>CBS 235.94; QM 474; ВР1 66;<br>VKPM F-977                              | BSL 1                | Авиационные и автомобильные детали и<br>оборудование;<br>краски; полимеры                   | 15, 9–11, 18, 33]               |
| <i>Penicillium funiculosum</i> Thom<br>(в наст. время – <i>Talaromyces pinophilus</i> (Hedgcock) Samson et al.)                   | ATCC 36839; CBS 631.66; IMI 114933;<br>IAM 7013   | BSL 1                | Пластик; текстиль   | [46]                            |
| <i>Penicillium ochrochloron</i> Biourge<br>(в наст. время – <i>Penicillium ludwigii</i> Udagawa)                                  | ATCC 9112; ATCC 9824; CBS 110.66;<br>NRRL 744; USDA 1336.2; DSM 1945;<br>IMI 61271; QM 477;<br>VKM F-1827; VKPM F-920                   | BSL 1                | Авиационные детали и трансмиссии;<br>кожа; пластик; текстиль;<br>электронное оборудование   | 12, 4, 5, 9, 11,<br>13, 15, 18] |

Таблица 1. Окончание

| Тест-культура   | Номер штамма в коллекциях  | Уровень безопасности | Повреждаемые материалы/тест  | Нормативный документ                     |
|---|--|----------------------|--|--|
| <i>Penicillium pinophilum</i> Thom<br>(в наст. время в ATCC – <i>Talaromyces pinophilus</i> (Hedgcock) Samson et al.) | ATCC 9644; (CBS 170.60; NRRL A-5245; NRRL 3503; CBS 170.60; DSM 1960; IFO 6345; IMI 87160; QM 391; SN 41; VKM F-1115; VKPM F-896; WDCM 00194 | BSL 1                | Авиационные детали и трансмиссии; биоразлагаемые пластики (поли-бета-гидроксибутират); воск; древесина; изоляционные материалы; клеящие вещества; кожа; лаки; пластмассы, в частности поликапролактон; пробка; синтетические полимеры; упаковочные материалы; электронное оборудование | [2, 4, 5, 9, 11, 13, 15, 18, 31, 35, 42] |
| <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Saccardo) Bainier  | ATCC 36840; IMI 49528  | BSL 1                | Клеи; пластмассы; резина; технические масла и смазки; электрическое и электронное оборудование   | [4, 5, 9, 12, 18, 46]                    |
| <i>Talaromyces varians</i> (Smith) Samson et al.  | ATCC 10509; NRRL 2096; CBS 386.48; NRRL 2096; IFO 6112; IMI 40586; NCTC 4152; QM 7691  |                      | Текстиль   | [29]                                     |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> Burdissal  | ATCC 24725; NRRL 6361; CBS 481.73; IMI 174727; QM 9998; VKM F-1767; VKPM F-392, VKPM F-615   | BSL 1                | Древесина и деревянные изделия; лигноцеллюлоза; клеи; красители  | [31, 35]                                 |
| <i>Trichoderma virens</i> (Miller et al.) von Arx*  | ATCC 9645; CBS 430.54; NRRL 2314; DSM 1963; IAM 5061; IFO 6355; IMI 45553; NRRL 2314; QM 365; VKM F-1117; VKPM F-898                         | BSL 1                | Авиационные и автомобильные детали и трансмиссии; воск; древесина и пиломатериалы; изоляция; клеящие вещества; кожа; лаки; пластмассы; пробка; производные фенола; текстиль; упаковочные материалы; электрическое и электронное оборудование   | [5, 9, 11, 13, 18, 31, 33, 35, 46]       |
| <i>Wallemia sebi</i> (Fries) von Arx<br>(в наст. время – <i>Wallemia mellicola</i> Jancic et al.)                     | ATCC 42694; FRR 1471; CECT 20820; WDCM 00182   | BSL 1                | Тест на обсемененность сухих продуктов и кормов  | [16, 45]                                 |

Примечание. \* – Секвенирован геном.

Note. \* – Genome sequenced.

ях, в частности, в БРЦ ВКПМ (Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”).

Всемирным центром данных по микроорганизмам (World Data Centre for Microorganisms, WDCM) при Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC) выпускается периодически обновляемый Каталог референтных штаммов микроорганизмов (WDCM Reference Strains Catalogue, refs.wdcm.org/home.htm). В состав Каталога входят тест-организмы, предложенные Международной организацией по стандартам (ISO) и Международным комитетом по пищевой микробиологии и гигиене (International Committee on Food Microbiology and Hygiene, ICFMH) для использования в определенных международных или региональных стандартах при тестировании продуктов, в качестве положительных и отрицательных контролей либо организмов-индикаторов. Последняя 27 версия включает 36 штаммов мицелиальных грибов и дрожжей, принадлежащих к 27 видам. В то же время многие штаммы микромицетов, используемые в качестве тест-культур, в частности микодеструкторы, в Каталоге не представлены, но указаны в других нормативных документах.

В международных стандартах, относящихся к производству питательных сред для культивирования грибов и других изделий медицинского назначения, тест-объектами служат дрожжи рода *Candida* и ряд микромицетов. Штаммы *Aspergillus restrictus* ATCC 42693 (WDCM 00183), *Eurotium rubrum* ATCC 42690 (WDCM 00184) используют для контроля изготовления среды DG 18, а *A. brasiliensis* ATCC 16494 (WDCM 00053) и *Mucor racemosus* ATCC 42647 (WDCM 00181) – для среды DRBC [16]. Штамм *A. brasiliensis* ATCC 16404 (VKM F-3882) указан также как тест-культура для контроля качества среды Сабуро [7], для определения фунгицидной активности дезинфицирующих средств [20], и наряду со штаммом *A. brasiliensis* ATCC 9642 (VKM F-1119) включен в фармакопейную статью по определению эффективности антимикробных консервантов [25].

Два стандарта ISO определяют метод подсчета жизнеспособных дрожжей и плесневых грибов во влажных [44] и сухих [45] продуктах питания и кормах для животных, включающий инфицирование продуктов культурами грибов и последующую проверку на обсемененность. В качестве тест-объектов для первой методики рекомендованы *A. niger* ATCC 16404 и *Mucor racemosus* ATCC 42647, для второй – ксерофильные виды *A. restrictus* ATCC 42693, *Eurotium rubrum* ATCC 42690 и *Wallemia sebi* ATCC 42694.

Для тестирования антимикотиков и фунгицидов на основе рекомендаций Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) и Европейского комитета по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) формируется набор стандартных штаммов грибов, включающий как штаммы, относящиеся к первому уровню биобезопасности (BSL 1), так и депонированные в коллекциях клинические изоляты уровня BSL 2. В соответствии со стандартами CLSI [39, 40] и EUCAST [41] тестирование противогрибковых лекарственных средств проводится в 96-луночных планшетах по скорости роста референтных штаммов в среде с различными концентрациями препарата. Различия в методиках, рекомендованных этими стандартами, заключаются в конфигурации планшетов, составе инкубационной среды, используемом диапазоне концентраций препарата и объеме посевного материала – суспензии конидий. Кроме того, в отличие от методики EUCAST, в рекомендациях CLSI указан также диско-диффузионный метод [38]. Включение штаммов в стандарт CLSI в качестве тест-культур осуществлялось на основании результатов анализов с большой выборкой наиболее распространенных противогрибных препаратов разной природы. Стабильным признаком должна быть чувствительность выбранных штаммов к препарату, а его минимальные ингибирующие концентрации приближены к середине серии его двукратных разведений. С учетом этих критериев к тест-культурам были отнесены *A. flavus* ATCC 204304, *A. fumigatus* ATCC 3626, *A. fumigatus* ATCC 3627, *A. terreus* ATCC MYA-3633, *Fusarium solani* ATCC 3636, *F. verticillioides* (ранее *F. moniliforme*) ATCC 3629 и *Hamigera insecticola* (ранее *Paecilomyces variotii*) ATCC 3630 [40, 47]. Контрольные штаммы *A. flavus* ATCC 204304 и *A. fumigatus* ATCC 204305 указаны в методике EUCAST для определения минимальных ингибирующих концентраций антимикотиков [41].

Указанные культуры широко используются как тест-объекты при характеристике новых антимикотиков и как штаммы сравнения в скрининге природных изолятов по устойчивости к различным препаратам. Например, на модели *A. flavus* ATCC 204304 был показан механизм действия валидомицина А – ингибирование трегалазы в конидиях и подавление их прорастания, а также синергический эффект валидомицина А и амфотерицина В при угнетении роста гриба [49]. Штаммы *A. flavus* ATCC 204304 и *A. fumigatus* ATCC 204305 служили контролем при изучении чувствительности 168 клинических изолятов аспергиллов, принадлежащих к 17 видам, к новому ингибитору синтеза 1,3-β-D-глюкана Ибрексафунгерпу, нахо-

длежащему в стадии клинической разработки. Препарат обнаружил высокую активность по отношению к большинству видов, а также к азол-резистентным штаммам *A. fumigatus* [50]. Сравнительный анализ воздействия семи различных антимикотиков на 390 штаммов аспергиллов-возбудителей больничных инфекций и референтные штаммы *A. fumigatus* ATCC MYA-3627 и *A. terreus* ATCC MYA-3633 выявил у многих изолятов относительно высокий уровень устойчивости к азольным соединениям [48]. Штамм *P. variotii* ATCC 3630 был выбран в качестве штамма сравнения при определении эффективности новых азольных препаратов против клинических и природных изолятов меланизированных грибов [51] и при оценке антимикотика Таваборола [30].

Использование в пищевой и санитарной микробиологии учитывает в большей степени характер и особенности роста микромицетов на лабораторных питательных средах, нежели разнообразие их ферментативных и метаболических свойств. В то же время именно оно определяет основную область применения грибных референтных культур — тестирование различных природных и промышленных объектов хозяйственного назначения на устойчивость к биодеструкции.

Согласно общей схеме испытаний на грибоустойкость с использованием тест-культур на исследуемый образец наносят суспензию спор одного гриба или смеси спор разных грибов, инкубируют на агаризованной среде либо в климатической камере при различных значениях температуры и влажности в течение определенного промежутка времени, периодически отмечая характер роста микроорганизма. По окончании срока инкубации определяют степень развития гриба, характер и степень биоповреждения материала и наличие в нем грибных метаболитов. Оценка эффективности различных средств защиты материалов предполагает как стандартную оценку фунгицидной и фунгистатической активности на питательных средах с использованием тест-культур, так и испытание по вышеприведенной методике приобретенной биостойкости материала после его обработки фунгицидом.

Выбор тест-культур микодеструкторов определяется их способностью расти на различных материалах, используя в качестве источника питания какой-либо компонент материала или несколько компонентов. В эту группу входят микромицеты, выделенные, как правило, непосредственно из очагов биоповреждений и в отсутствие легкодоступных органических веществ обладающие выраженной активностью (агрессивностью) по отношению к различным материалам, изделиям и деталям [21, 26, 28].

Повреждения микромицетами различных материалов (текстиль, металл, бетон, пластмассы, резина, кожа, топливо, лаки, краски, бумага и т.д.) и изделий на их основе осуществляются путем механического разрушения растущим мицелием, биозагрязнения (пигментами и т.д.) и, в первую очередь, под воздействием секретируемых грибами ферментов и органических кислот. Широкий спектр продуцируемых ферментов позволяет грибам колонизировать и разрушать субстраты с различной химической структурой. Виды *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria* способны повреждать самые различные материалы. В то же время и представители этих родов, и другие грибы обладают более выраженной деструктивной способностью по отношению к определенным материалам.

Биоразрушение гидрофобных, неполярных веществ типа углеводов, а также материалов, образованных циклическими соединениями, происходит под действием оксигеназ. Наиболее важным объектом, содержащим углеводороды, является топливо, его повреждение чаще всего осуществляется продуцирующими оксигеназы видами *Cladosporium*, *Penicillium*, преимущественно *C. resinae* и *P. chrysogenum*.

В разложении ряда полимерных материалов (резины, лаков) участвуют липазы, углеводородов, масел, смазок и их производных — липазы и оксидоредуктазы. Микробиологическое повреждение полимерных и лакокрасочных материалов в большинстве случаев является следствием заселения этих материалов видами *Aspergillus* (*A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. funiculosum*), *Stemphylium* (*S. botryosum*), *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria* (*A. alternata*), *Aureobasidium pullulans*, продуцирующими эти ферменты. Разложение масел и смазок происходит чаще в результате воздействия *Aspergillus* (*A. niger*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*), *Fusarium* (*F. sambucinum*), *Scopulariopsis*. В деструкции кожаных изделий участвуют коллагеназы, липазы и протеазы, субстратов на минеральной основе — фенолоксидазы, образуемые преимущественно видами *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, бумаги, картона и изделий из древесины — целлюлолитические ферменты, активные у целого ряда микромицетов, в первую очередь *Trichoderma* и *Phanerochaete chrysosporium*. Виды *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* обладают значительной пероксидазной активностью. Пероксидаза катализирует окисление перекисью водорода различных органических соединений — фенолов, аминов, гетероциклических соединений и играет важную роль в разложении ряда пластмасс, в частности, полиэтилена. Протеиназы и эстеразы участвуют в деструкции полимеров, содержащих амидные и сложноэфирные связи: мочевинофор-

мальдегидных полимеров, акриламидов, полиамидов (капрон, нейлон) и полиуретанов (поролон). Высокая эстеразная активность характерна для представителей рода *Paecilomyces*.

Серьезную деструкцию как органических, так и неорганических материалов, включая металлы, вызывают продуцируемые микромицетами органические кислоты [53]. Виды рода *Penicillium* выделяют главным образом лимонную и глюконовую кислоты, *Aspergillus* – лимонную, глюконовую и щавелевую (активным продуцентом лимонной кислоты является штамм *A. niger* ATCC 6275), а мукоровые грибы – молочную и фумаровую. Такие полимерные материалы, как полиэтилен, полипропилен, полистирол, сами по себе более устойчивы к действию органических кислот, чем поливинилхлорид, полиметилакрилат и полиамидные смолы, однако входящие в состав многих видов пластмасс органические наполнители служат субстратом для грибов, что усиливает кислотообразование. Органические кислоты вызывают сильное повреждение лакокрасочных покрытий и различных целлюлозосодержащих материалов, но в первую очередь являются источником коррозии металлов и причиной повреждения деталей и конструкций. Коррозию металлов и сплавов наиболее часто вызывают виды *Aspergillus* (*A. flavus*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. funiculosum*), *Alternaria*, *Paecilomyces*. С накоплением кислот связывают и биодеструкцию оптического и защитного стекла, которую вызывают *Aureobasidium pullulans* и виды *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. versicolor*) и *Penicillium*.

В ряде рекомендаций по проверке материалов на устойчивость к грибному поражению указаны штаммы, входящие в Каталог референтных штаммов микроорганизмов WDCM. В стандарте [43], предназначенном для тестирования противогрибной активности различных текстильных изделий, где рост гриба определяется по интенсивности люминесценции внутриклеточного АТФ, заявлены *Cladosporium cladosporioides* ATCC 11277 (WDCM 00190) и *Penicillium citrinum* ATCC 9849 (WDCM 00189) Тест-культуры *A. niger* ATCC 6275 (WDCM 00144) и *P. pinophilum* ATCC 9644 (WDCM 00194) предложены для метода оценки противогрибной активности керамических фотокаталитических пленок по подсчету спор, выживающих при освещении ультрафиолетовым светом [10, 42].

Многие штаммы, не включенные в Каталог WDCM, указаны в других стандартах и методиках и используются в исследованиях как стандартные биомаркеры устойчивости промышленных материалов к колонизации грибами (табл. 1). Обширный и разнообразный набор механизмов биодеструкции, более выраженная субстратная специфичность и определяемый ей профиль объектов обуславливают включение различных штаммов в

соответствующие стандарты. Так для оценки воздействия микроорганизмов

на пластики используют *A. niger* ATCC 6275, *C. globosum* ATCC 6205, *P. variotii* ATCC 18502, *P. funiculosum* ATCC 36839, *T. virens* ATCC 9645 [17, 45],

на синтетические полимеры – *A. niger* ATCC 9642, *A. pullulans* ATCC 15233,

*C. globosum* ATCC 6205, *P. pinophilum* ATCC 11797, *T. virens* ATCC 9645 [32, 51],

на клеящие материалы – *A. flavus* ATCC 9643, *A. niger* ATCC 9642, *A. pullulans* ATCC 15233, *C. globosum* ATCC 6205, *P. pinophilum* ATCC 9644, *Ph. chrysosporium* ATCC 24725, *T. virens* ATCC 9645 [30].

Часто в исследованиях используют не сертифицированные тест-культуры, а природные isolates, выделенные у больных людей либо из очагов повреждения различных материалов. Следует отметить, что применение таких нестандартизированных методов оценки чувствительности грибов может привести к получению заведомо ложных результатов и к серьезным ошибкам при выборе препаратов для лечения либо защиты от биоповреждений. В то же время, несмотря на большое разнообразие тест-культур биодеструкторов, существует необходимость расширения их набора. В случае возбудителей микозов нередко выделяют штаммы с повышенной резистентностью к противогрибным препаратам, природной либо приобретенной в результате неконтролируемой лекарственной терапии. У таких штаммов увеличены значения МИК (минимальной ингибирующей концентрации) препарата, а также изменены структуры мишеней действия антимикотика в результате спонтанных мутаций в кодирующих их генах, что приводит к снижению или утрате способности мишени связываться с антимикотиками.

При определении грибостойкости коллекционные тест-культуры, ранее выделенные по высокой повреждающей способности к ряду материалов, в результате длительного хранения в лабораторных условиях на искусственных питательных средах снижают свою агрессивность, в частности, обладают меньшей активностью кислотообразования [1, 22]. За последнее время появилось множество новых устойчивых к данным коллекционным культурам синтетических материалов, улучшились условия их хранения, созданы новые биоцидные препараты. Микромицеты в природных условиях в силу высокой пластичности адаптируются и к новым материалам, и к новым средствам защиты, и среди этих грибов постоянно появляются новые высокоагрессивные штаммы, превосходящие по активности деструкции известные тест-культуры [22, 23]. В связи с этим важен постоянный поиск и выделение таких штаммов, изучение их свойств, использова-



ние в тестировании на чувствительность к антимикотикам и испытании материалов на грибоустойчивость.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России, Соглашение № 075-15-2021-1053.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горбань М.В., Ямпольская Т.Д. Физиологические аспекты деструкции синтетических и природных полимеров коллекционными и аборигенными штаммами микромицетов. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2012, 14, 1(9), 2206–2210.
2. ГОСТ 12.4.152–85 Кожа искусственная. Методы определения грибоустойчивости.
3. ГОСТ 16962–71 Изделия электронной техники и электротехники. Механические и климатические воздействия. Требования и методы испытаний.
4. ГОСТ 20.57.406–81 Комплексная система контроля качества. Изделия электронной техники, квантовой электроники и электротехнические. Методы испытаний
5. ГОСТ 28206 Основные методы испытаний на воздействие внешних факторов. часть 2 Испытания. Испытание J и руководство – грибоустойчивость.
6. ГОСТ 30028.4–93 Межгосударственный стандарт средства защитные для древесины. Экспресс-метод оценки эффективности антисептиков против деревоокрашивающих и плесневых грибов.
7. ГОСТ Р 70152–2022 Качество воды. Методы внутреннего лабораторного контроля качества проведения микробиологических и паразитологических исследований.
8. ГОСТ 9.023–74 ЕСЗКС Топлива нефтяные. Метод лабораторных испытаний биостойкости топлив, защищенных противомикробными присадками.
9. ГОСТ 9.048–89 ЕСЗКС Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов.
10. ГОСТ 9.049–91. Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов.
11. ГОСТ 9.050–75 ЕСЗКС Покртия лакокрасочные. Методы лабораторных испытаний на устойчивость к воздействию плесневых грибов.
12. ГОСТ 9.052–88 ЕСЗКС Масла и смазки Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов.
13. ГОСТ 9.085–78 ЕСЗКС Жидкости смазочно-охлаждающие Методы испытаний на биостойкостьюю.
14. ГОСТ 9.801–82. ЕСЗКС. Бумага. Методы определения грибоустойчивости.
15. ГОСТ 9.802–84 Ткани и изделия из натуральных, искусственных, синтетических волокон и их смесей. Метод испытания на грибоустойчивость.
16. ГОСТ ISO 11133–2016 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред.
17. ГОСТ Р 57859–2017 Композиты полимерные. Методы испытаний на воздействие плесневых грибов.
18. ГОСТ Р 70005–2022 Сохранение объектов культурного наследия от биопоражений Классификация, методы защиты и ликвидации последствий. Общие требования.
19. ГОСТ Р ЕН 12322–2010 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред.
20. Изменения, вносимые в раздел 20 главы II Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 03.08.2021 N 99 “О внесении изменений в раздел 20 главы II Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)”.
21. Лугаускас А.Ю., Микульскене А.И., Шляужене Д.Ю. Каталог микромицетов – биодеструкторов полимерных материалов. – М., Наука. 1987. 341 с.
22. Карнов В.А., Семенова Т.А., Иванова А.Е., Ковальчук Ю.Л., Комарова К.А., Смирнов В.Ф. Штамм микроскопического гриба *Penicillium sclerotiorum* J.F.H. Веума ВКМ F-4837D, являющийся активным агентом биоповреждений промышленных материалов. Патент RU 2776487C1, 13.09.2021, опубл. 21.07.2022, бюл. № 21.
23. Матюша Г.В., Карташева Т.А., Герасименко А.А., Самунина А.А., Сизова Т.П. Штамм гриба *Aspergillus flavus* Link как тест-культура для определения грибоустойчивости сталей, оксидных алюминиевых и магниевых сплавов. Патент RU 1766073, 27.12.1990, опубл. 19.06.1995.
24. Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Кочкина Г.А., Абсаямов С.Я. Тестовые штаммы микроскопических грибов для проведения испытаний на грибоустойчивость промышленных материалов. *Современная микология в России*, 2020, 8, 371–375.
25. Определение активности антимикробных консервантов лекарственных средств (ОФС 42-0069-07). Государственная Фармакопея Российской Федерации. – 2007. – Издание 12. Часть 1. 216–219.
26. Пехташева Е.Л. Биоповреждения и защита непродовольственных товаров. М.: Мастерство. 2002, 224 с.

27. Санитарные правила и нормы СанПиН 1.2.3685-21 “Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания” от 01.03.2021.
28. Сухаревич В.И., Кузикова И.Л., Медведева Н.Г. Защита от биоповреждений, вызываемых грибами. СПб: ЭЛБИ-СПБ. 2009, 206 с.
29. AATCC Test Method 30-2004. Antifungal activity, assessment on textile materials: mildew and rot resistance of textile materials. AATCC Technical manual. 2005, 81–84.
30. Abastabar M., Haghani I., Shokohi T., Hedayati M.T., Aghili S.R., Jedi A., Dadashi S., Shabanzadeh S., Hosseini T., Aslani N., Meis J.F., Badali H. Low in vitro antifungal activity of Tavaborole against yeasts and molds from onychomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2018, 62(12), e01632-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01632-18>
31. ASTM International D 4300-01. Standard test methods for ability of adhesive films to support or resist the growth of fungi. ASTM International, West Conshohocken, PA. 2001.
32. ASTM D4445-03. Standard test method for fungicides for controlling sapstain and mold on unseasoned lumber (laboratory method). ASTM International, West Conshohocken, PA. 2003.
33. ASTM G21-09. Standard practice for determining resistance of synthetic polymer materials to fungi. ASTM International, West Conshohocken, PA. 2009.
34. ASTM D 3273-00. Standard test method for resistance to growth of mold on the surface of interior coatings in an environmental chamber. ASTM International, West Conshohocken, PA. 2000.
35. ASTM D 4783-01. Standard test methods for resistance of adhesive preparations in container to attack by bacteria, yeast, and fungi. ASTM International, West Conshohocken, PA. 2001.
36. ASTM Standard E 1259, 2010d. Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C. West Conshohocken, 2010.
37. AWWA E24-06. Standard method of evaluating the resistance of wood product surfaces to mold growth. American Wood-Preservers' Association, 2006.
38. Berkow E.L., Lockhart S.R., Ostrosky-Zeichner L. Antifungal susceptibility testing: current approaches. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2020, 33(3), e00069-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-19>
39. CLSI. 2017. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi M38. CLSI, Wayne, PA, USA.
40. CLSI. 2020. Performance standards for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi M61. CLSI, Wayne, PA, USA.
41. EUCAST Definitive document E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds, 2008
42. ISO 13125:2013 Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Test method for antifungal activity of semiconducting photocatalytic materials.
43. ISO 13629-1:2012 specifies a test method for the quantitative determination of the antifungal activity by measuring the intensity of luminescence produced by an enzymatic reaction [adenosine triphosphate (ATP) method].
44. ISO 21527-1:2008. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of yeast and molds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95.
45. ISO 21527-2:2008. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of yeast and molds. Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal 0.95.
46. ISO 846:2019 Plastics—Evaluation of the action of microorganisms. Vernier, Geneva. 2019.
47. Lass-Flörl C., Cuenca-Estrella M., Denning D.W., Rodríguez-Tudela J.L. Antifungal susceptibility testing in *Aspergillus* spp. according to EUCAST methodology. *Med. Mycol.*, 2006, 44, S 319–S325. <https://doi.org/10.1080/13693780600779401>
48. Li Y., Wang H., Zhao Y.-P., Xu Y.-C., Hsueh P.-R. Antifungal susceptibility of clinical isolates of 25 genetically confirmed *Aspergillus* species collected from Taiwan and Mainland China. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2020, 53(1), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.04.003>
49. Plabutong N., Ekronarongchai S., Niwetbowornchai N., Edwards S.W., Virakul S., Chiewchengchol D., Thammasong A. The inhibitory effect of validamycin A on *Aspergillus flavus*. *Int. J. Microbiol.*, 2020, 3972415. <https://doi.org/10.1155/2020/3972415>
50. Rivero-Menendez O., Soto-Debran J.C. Cuenca-Estrella M., Alastruey-Izquierdo A. In vitro activity of Ibrexafungerp against a collection of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species and Cyp51A mutants, using EUCAST and CLSI methodologies. *J. Fungi*, 2021, 7(3), 232. <https://doi.org/10.3390/jof7030232>
51. Shokoohi G.R., Badali H., Mirhendi H., Ansari S., Rezaei-Matehkolaei A., Ahmadi B., Vaezi A., Alshahni M.M., Makimura K. In vitro activities of luliconazole, laniconazole, and efinaconazole compared with those of five antifungal drugs against melanized fungi and relatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2017, 61(11), e00635-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00635-17>
52. Vivi V.K., Martins-Franchetti S.M., Attili-Angelis D. Biodegradation of PCL and PVC: *Chaetomium globosum* (ATCC 16021) activity. *Folia Microbiol.*, 2019, 64, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0621-4>
53. Zhao J., Czetyenyi L., Gadd G.M. Biocorrosion of copper by *Aspergillus niger*. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 2020, 154. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105081>

## Test Cultures of Micromycetes for Studying Antimycotics and Evaluating the Fungal Resistance of Industrial Materials

Yu. A. Rybakov<sup>a, b, #</sup>

<sup>a</sup>*Russian State Collection of Industrial Microorganisms National Bio-Resource Center, Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, 117545 Russia*

<sup>b</sup>*Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, 123182 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: yrybakov@genetika.ru*

**Abstract**—The present review describes the main cultures of micromycetes included in the international and Russian standards and used for quality assessing of nutrient media, testing antimycotics and evaluating industrial materials for fungal resistance.

*Keywords:* micromycetes, antimycotics, fungus resistance