

Oznaczenie grzybów pleśniowych na powierzchni materiału i ocena oddziaływania grzybów na materiał budowlany

Dr inż. Daria Horbik, Centrum Usług Techniczno Organizacyjnych Budownictwa Polskiego Związku Inżynierów i Techników Budownictwa

1. Wprowadzenie

W artykule przedstawiono występowanie grzybów pleśniowych, ich budowę i wpływ na człowieka, oznaczenie i ocenę oddziaływania grzybów pleśniowych na powierzchni materiału. Jest to bardzo ważne zagadnienie ze względu na ich częstość występowania. Do najczęściej stosowanych metod oznaczania grzybów pleśniowych na powierzchni materiału należą: metody wizualne, hodowlane, odciskowe, metody oznaczeń taksonomicznych oraz metody analizy chemicznej.

2. Grzyby pleśniowe

2.1. Występowanie grzybów pleśniowych

Na zawilgoconych ścianach i drewnie może występować co najmniej kilkadziesiąt gatunków grzybów tzw. pleśniowych lub mikroskopowych. Ich naturalnym środowiskiem jest gleba, ale mogą niszczyć także zawilgocone wytwory papiernicze, tkaniny, wyroby skórzane, a także źle zabezpieczone lub zbyt długo przechowywane produkty spożywcze. Występują w powietrzu, które nie jest co prawda miejscem ich rozwoju, ale środowiskiem, w jakim mogą się przemieszczać i rozprzestrzeniać. W powietrzu atmosferycznym jest

zazwyczaj więcej zarodników grzybów pleśniowych niż w powietrzu pomieszczeń, jeśli w pomieszczeniach nie występują tzw. wewnętrzne źródła zagrzybienia, np. zapleśniale ściany (rys. 1–4).

2.2. Budowa grzybów pleśniowych

Grzyby pleśniowe są to mikroorganizmy, ich budowa jest dostrzegalna tylko pod mikroskopem. Tworzą tzw. strzępki, czyli nitkowate, rozgałęziające się komórki, które płożą się na powierzchni materiałów lub wrastają w podłoża, oraz mikroskopijne, zazwyczaj barwne komórki służące do rozmnażania się – zarodniki. Strzępki grzybów pleśniowych wytwarzają enzymy, które rozkładają materiały organiczne (drewno, tapety, kleje) oraz kwasy organiczne, które powoli nadtrawiają i uszkadzają materiały nieorganiczne (tynki, cegły, kamień). Barwne zarodniki, a u niektórych grzybów także barwne strzępki lub pigmenty wydzielane do podłoża powodują szare, czarne, zielone względnie różowe zaplamienia lub naloty.

3. Wpływ grzybów na człowieka

Zarodniki grzybów pleśniowych są bardzo lekkie i z łatwością odrywają się od przegród budowlanych, na których



Rys. 1. Grzyby powstały na skutek źle zaizolowanej ściany piwnicy



Rys. 2. Odpadający tynk na skutek działania grzybów



fot. D. Horbik

Rys. 3. Odpadający tynk na skutek działania grzybów

fot. D. Horbik

Rys. 4. Spękania ściany spowodowane rozwojem grzybów

rosną, a następnie unoszą się w powietrzu w pomieszczeniach i są wdychane przez obecnych tam ludzi. Częsteczki pyłu lub kurzu uważa się za „wdychalne”, jeśli mają średnicę aerodynamiczną mniejszą niż 7 mm, natomiast jeśli są większe, określa się je jako „niewdychalne”. Najłatwiej osadzają się w płucach cząstki o wielkości 1–5 mm, a w tym przedziale mieszczą się rozmiary większości grzybów pleśniowych, głównie z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*. Grzyby pleśniowe mogą wywoływać u ludzi trzy rodzaje chorób: alergię, grzybicę (mykozy) i zatrucia grzybowe (mykotoksykozy):

- alergię – lista alergizujących grzybów pleśniowych obejmuje co najmniej 14 gatunków, głównie z rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*, a także *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Wallemia*, *Eurotium*. Wśród chorób wywoływanych przez alergeny grzybowe u osób na nie uczulonych najczęściej wymienia się alergiczny katar i kaszel, a w poważniejszych przypadkach astmę oskrzelową, alergiczne zewnątrzopochodne zapalenie pęcherzyków płucnych (*alveolitis allergica*), atopowe zapalenie spojówek i inne;

- grzybicę – narażenie na zarodniki grzybów pleśniowych może prowadzić do rozwoju infekcji w tkankach ludzkich spowodowanych wtargnięciem i rozwojem grzybów pleśniowych. Inhalacyjne zakażenie układu oddechowego zarodnikami grzybów pleśniowych sprzyja powstawaniu różnych postaci grzybic narządów układu oddechowego (np. grzybicy płuc);

- mikotoksykozy są to zatrucia wywoływane wprowadzaniem toksyn grzybów pleśniowych (mikotoksyn) do organizmu człowieka (drogą pokarmową lub przez wdychanie). Co prawda, najczęściej do narażenia na mikotoksyny dochodzi drogą pokarmową, jednak badania ostatnich lat wykazały, że wdychanie cząstek pleśniowych zawierających toksyny może być nawet bardziej niebezpieczne niż wprowadzanie ich drogą pokarmową. Zazwyczaj w środowisku człowieka mikotoksyny występują w bardzo niskich stężeniach, jeśli jednak człowiek oddycha powietrzem, w którym stężenie zarodników grzybów jest wysokie, to mikotoksyny powodują zatrucia przewlekłe. Drogą inhalacyjną

w większych ilościach dostają się one do organizmu człowieka głównie przy niewłaściwie (bez środków ochrony osobistej) wykonywanych remontach, a szczególnie podczas usuwania nalotów pleśni ze ścian. Początkowo mikotoksykozy charakteryzują się objawami takimi jak uczucie przewlekłego zmęczenia, bóle głowy, biegunki, bóle mięśni, katar, częste zachorowania podobne do grypy, a po latach mogą prowadzić do uszkodzenia wątroby, nerek, a nawet do powstania nowotworu. W budynkach, gdzie w materiałach budowlanych stwierdzono występowanie grzybów toksynogennych, u mieszkańców występowały niespecyficzne objawy prawdopodobnie związane obecnością mikotoksyn – kaszel, podrażnienie oczu, skóry, dróg oddechowych, bóle stawów, bóle głowy oraz zmęczenie. W niektórych przypadkach, kiedy stwierdzano *Stachybotrys chartarum*, skutkiem były krwotoki w płucach. U osób, u których wykryto choroby płuc, a które pracowały w zapleśniałych budynkach, wskazano jako grzyby odpowiedzialne *Stachybotrys chartarum* i *Aspergillus versicolor*. W przypadku tych dwóch gatunków udało się jednoznacznie wskazać na związek pomiędzy narażeniem na działanie mikotoksyn a chorobami związanymi z mieszkaniem w zagrzybionych budynkach.

4. Oznaczanie grzybów pleśniowych na powierzchni materiału

Do oznaczania zanieczyszczenia powierzchni grzybami stosuje się poniższe metody.

- Metody wizualne polegające na określaniu procentowego skażenia powierzchni próbki przez grzyby pleśniowe. Stopień skażenia oznaczano wizualnie (okiem nieuzbrojonym lub mikroskopowo). W metodach tych jest możliwość określenia liczby gatunków zasiedlających materiał [1, 9, 13].

- Metody hodowlane pozwalające na wykrycie ogólnego stanu zagrzybienia. W metodzie tej określa się liczbę jednostek tworzących kolonie na metr kwadratowy jtk/m² lub ocenia liczebność kolonii grzybów danego gatunku wyhodowanych na specjalnych podłożach selektywnych [4, 9].

- Metody odciskowe polegające na wykorzystaniu specjalnych płytek o wypukłej powierzchni. Umożliwia to pobranie dokładnego odcisku badanej powierzchni. Po określonym czasie inkubacji odczytuje się, zależnie od typu płytki, liczbę kolonii lub porównuje gęstość wyrosniętej kolonii.
- Metody oznaczeń taksonomicznych (próbki do badań pobiera się w podobny sposób jak w metodzie odciskowej). Po okresie inkubacji przynależność pleśni do rodzaju i gatunku określa się na podstawie budowy anatomicznej grzybów, korzystając z kluczy i atlasów [1, 9, 13].
- Metody analizy chemicznej to metody enzymatyczne, metody immunologiczne lub metody oznaczania składników komórkowych, takich jak: chityna lub ergosterol. Ergosterol jest charakterystycznym składnikiem błon komórkowych grzybów. Jego odpowiednikiem w błonie ssaków jest cholesterol. Związek ten obecny jest we wszystkich fazach rozwoju grzybni oraz w konidiach [2, 3, 10, 14, 15]. Szczegółowy opis przedstawiono poniżej.

5. Badania oddziaływania grzybów

5.1. Analiza obecności ergosterolu

Wyniki przeprowadzonych badań ergosterolu przedstawia tabela 1.

5.2. Obrazy mikroskopowe SEM

Do określania stopnia rozwoju grzyba i zmian zachodzących w materiałach po różnych terminach badawczych wykorzystano mikroskopię skaningową SEM wraz z bezwzorcową mikroanalizą rentgenowską EDS [12]. Obserwacje zmian rozwoju samych grzybów, jak i zmian zaistniałych w badanych materiałach w wyniku rozwoju lub zaniku grzybów prowadzono z użyciem mikroskopu skaningowego VEGA TS 5135 MM z mikrosondą rentgenowską przy parametrach:

- napięcie przyspieszające – 25 kV,

- niska próżnia – 10 Pa,
- elektrony odbite BSE dla określania struktur materiałów oraz
- elektrony wtórne SE dla określania stopnia rozwoju grzybów.

5.3. Pomiary bioluminescencji

Stopień porażenia, szybkość rozwoju oraz zdolność do rozwoju (w przypadku występowania w formie utajonej) stosowanych grzybów oceniałam także na podstawie natężenia bioluminescencji I ($I = \text{impuls/h} \times \text{mm}^2$) odczytanego z obrazów rejestrowanych w technice zliczania pojedynczych fotonów ultraczułą kamerą CCD. Próbki materiałów budowlanych zainfekowane wybranymi rodzajami grzybów i próbki wzorcowe umieszczone zostały na metalowych szalkach w komorze pomiarowej kamery i następnie rejestrowane obrazy luminescencyjne.

Rejestracja fotografii i obrazów luminescencyjnych przeprowadzona została kamerą „Night Owl” wyprodukowaną przez EG&G Berthold (Niemcy). Analiza uzyskanych obrazów luminescencyjnych została przeprowadzona za pomocą współpracującego z kamerą programu „WinLight”.

Kamera „Night Owl” jest wyposażona w wolno skanującą oświetlaną od tyłu (*back illumination*) matrycę światłoczułą CCD, czułą na promieniowanie świetlne w zakresie 200 do 1100 nm o rozdzielczości geometrycznej obrazu 512/512 punktów. Matryca ta jest utrzymywana w temperaturze 223 K przez wielowarstwowy, powietrznie chłodzony, element Peltier’a. Rozwiązanie to pozwala uzyskać niezwykle mały prąd ciemny $\leq 5 \cdot 10^{-4} \text{ e}^-/\text{pixel/s}$.

Obserwowany obiekt jest rzutowany na matrycę CCD przez kwarcowy obiektyw o jasności $f = 0,95$.

Zależnie od wielkości natężenia emisji światła z obserwowanego obiektu czas zbierania obrazu można dobierać od milisekund do godzin. Rejestrowany obraz powstaje

Tabela 1. Zawartość ergosterolu w próbkach po różnych okresach od skażenia próbek w zależności od rodzaju materiału i rodzaju grzyba [7]

Materiał	Rodzaj grzyba	Zawartość ergosterolu [ng/g] ± SD*		
		Próbka nieskażona – wzorcowa	Po 1 miesiącu od skażenia	Po 6 miesiącach od skażenia
Granit	<i>Aspergillus</i>	0,0	16,1 ± 2,0	27,9 ± 3,8
	<i>Cladosporium</i>	0,0	12,6 ± 1,3	23,1 ± 2,8
	<i>Penicillium</i>	0,0	12,5 ± 1,5	21,7 ± 3,8
Ceramika	<i>Aspergillus</i>	0,0	12,0 ± 1,6	31,9 ± 10,4
	<i>Cladosporium</i>	0,0	10,5 ± 0,4	28,1 ± 4,8
	<i>Penicillium</i>	0,0	9,7 ± 1,1	24,2 ± 2,1
Beton	<i>Aspergillus</i>	0,0	6,3 ± 1,0	21,9 ± 1,4
	<i>Cladosporium</i>	0,0	7,5 ± 0,6	21,8 ± 2,5
	<i>Penicillium</i>	0,0	7,4 ± 0,6	24,1 ± 1,6
Tynk	<i>Aspergillus</i>	0,0	9,0 ± 1,7	32,1 ± 4,8
	<i>Cladosporium</i>	0,0	9,6 ± 0,8	21,7 ± 1,7
	<i>Penicillium</i>	0,0	8,2 ± 1,1	32,0 ± 1,6

*Badanie przeprowadzono na uśrednionej próbce uzyskanej z trzech badanych próbek.

Tabela. 2. Zestawienie porównawcze obrazów mikroskopowych SEM w zależności od rodzaju materiału i czasu działania grzyba *Aspergillus niger* [7]

	Wzorcowa	Po 1 miesiącu	Po 6 miesiącach
Granit			
Beton			
Ceramika			
Tynk			

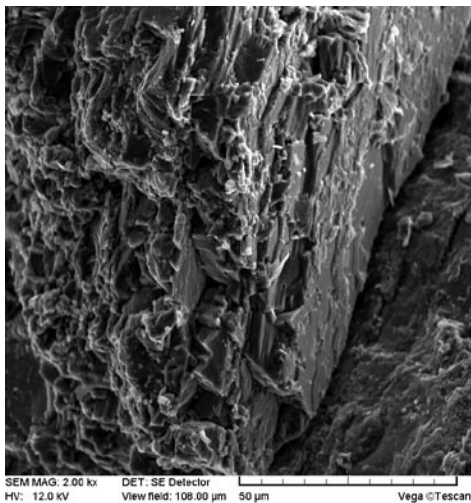
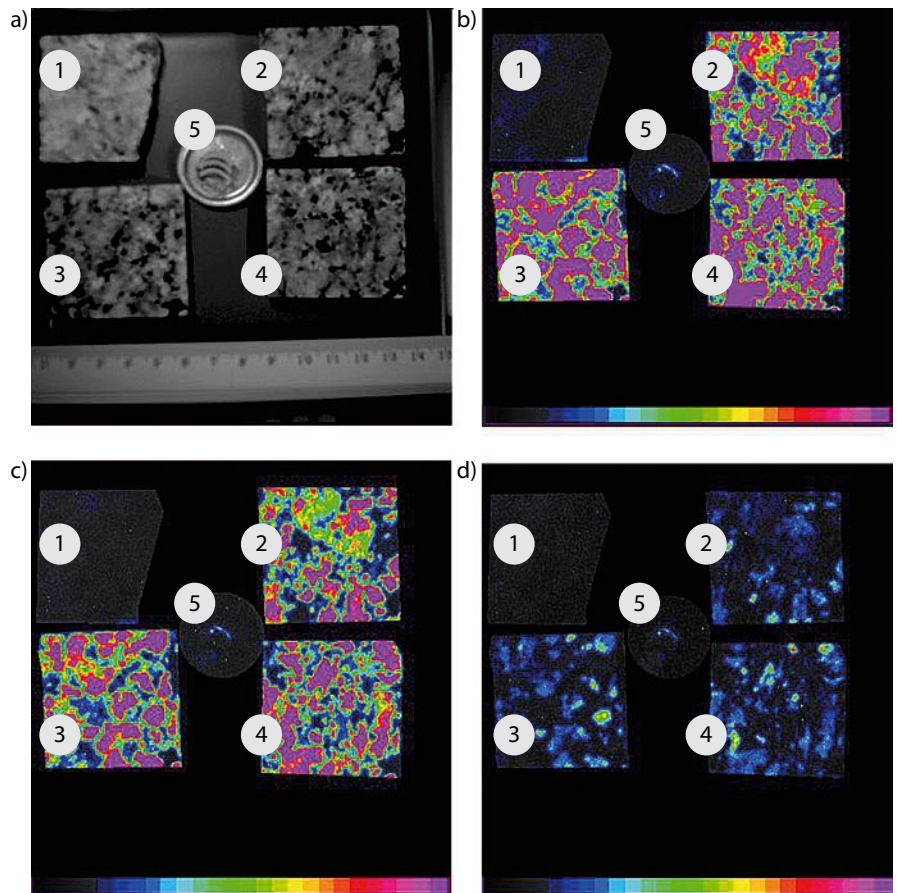
poprzez długotrwałe kumulowanie ładunku powstałego na skutek oddziaływania rejestrowanych fotonów z materiałem matrycy. Wykorzystywany tu sposób powstawania obrazu nosi nazwę obrazowania techniką zliczania pojedynczych fotonów i pozwala rejestrować emisję o bardzo małym natężeniu. Pozostałe narzędzia stanowiły typowe wyposażenie laboratorium chemicznego [5, 6, 8, 11, 12].

Procedurę odróżnienia „bioluminescencji” od luminescencji indukowanej światłem przedstawia rysunek 5.

5.4. Bezwzorcowa mikroanaliza rentgenowska EDS

Mikroanaliza EDS pozwala na identyfikację pierwiastków chemicznych wchodzących w skład badanego materiału [12]. Analiza EDS może mieć charakter jakościowy i ilościowy – jeśli jest dostępna próbka wzorcowa. Elektrony z wiązki pierwotnej padającej na badany materiał penetrują próbkę i oddziałują z atomami, z jakich jest ona zbudowana. Wysyłane przez próbkę promieniowanie X zbierane jest w detektorze EDS, a następnie sygnał przetwarzany jest i wyświetlany w postaci widma będącego zależnością liczby zliczeń

Rys. 5. Wygaszanie luminescencji indukowanej światłem (fotoindukcji) na próbkach granitu skażonego *Cladosporium cladosporioides*:
 a) widok ogólny próbek przed włożeniem do kamery,
 b) emisja po 1 h od włożenia do kamery (początek wyciemniania obrazu),
 c) emisja po 2 h od włożenia do kamery (wyciemnianie obrazu),
 d) emisja po 18 h od włożenia do kamery – emisja bioluminescencji (po wyciemnieniu obrazu) [7];
 1 – próbka wzorcowa, 2, 3, 4 – próbki po 1 miesiącu od skażenia grzybem,
 5 – wzorzec radioluminescencyjny ^{63}Ni

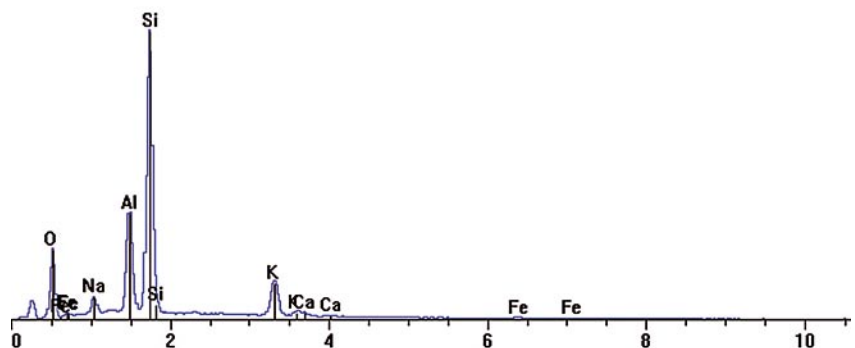


Rys. 6. Obraz mikroskopowy SEM dla próbek granitu [7]

Element	Line	Wt%	At%
O	KA1	46,31	60,70
Al	KA1	10,41	8,10
Si	KA1	33,64	25,12
K	KA1	6,08	3,26
Fe	KA1	0,41	0,16
Na	KA1	2,61	2,38
Ca	KA1	0,53	0,28
Total		100,00	100,00

■ granit swiadek_2_S001.pgt

FS: 16000



w funkcji energii promieniowania. Wartości energii promieniowania charakterystycznego pozwalają na identyfikację pierwiastkową w badanej próbce, podczas gdy intensywność pozwala na analizę ilościową.

Wykonana została bezwzorcowa mikroanaliza rentgenowska EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) dla próbek granitu i betonu z całej powierzchni badanych próbek przy użyciu mikroskopy rentgenowskiej będącej elementem składowym

Tabela 3. Oznaczanie wartości odczynu pH w zależności od rodzaju materiału, rodzaju grzyba i terminu badawczego [7]

Materiał	Rodzaj grzyba	pH*		
		Próbka wzorcowa – nieskażona	Po 1 miesiącu od skażenia	Po 6 miesiącach od skażenia
Granit	<i>Aspergillus</i>	7,90	7,94	9,55
	<i>Cladosporium</i>		7,98	9,47
	<i>Penicillium</i>		8,06	9,36
Ceramika	<i>Aspergillus</i>	7,93	7,96	9,22
	<i>Cladosporium</i>		7,95	9,24
	<i>Penicillium</i>		8,00	9,81
Beton	<i>Aspergillus</i>	12,30	12,08	11,46
	<i>Cladosporium</i>		11,69	11,00
	<i>Penicillium</i>		12,00	11,23
Tynk	<i>Aspergillus</i>	12,21	12,00	9,63
	<i>Cladosporium</i>		12,04	10,40
	<i>Penicillium</i>		12,06	10,04

* Badanie przeprowadzono na uśrednionej próbce uzyskanej z trzech badanych próbek

mikroskopu skaningowego VEGA TS 5135 MM. Badania te zostały przeprowadzone dla próbki wzorcowej nieskażonej i próbek skażonych grzybami pleśniowymi po 6 miesiącach ich działania. Określone zostały zmiany jakościowe i ilościowe w tych próbkach. Poniżej przedstawiono zestawienie porównawcze obrazów mikroskopowych SEM w zależności od rodzaju materiału i czasu działania grzyba dla *Aspergillus niger* [7].

5.5. Określenie odczynu pH

Jedną z przykładowych metod badań jest mierzenie pH wyciągów wodnych. Przykładowe wyniki badań przedstawia tabela 3.

6. Podsumowanie

Na zawilgoconych ścianach i drewnie może występować co najmniej kilkadziesiąt gatunków grzybów tzw. pleśniowych lub mikroskopowych. Grzyby są bardzo szkodliwe dla człowieka. Mogą wywoływać następujące rodzaje chorób: alergie, grzybice (mykozy) i zatrucia grzybowe (mykotoksykozy). W związku z powyższym bardzo ważna jest identyfikacja grzyba we wstępnym etapie rozwoju i znalezienie skutecznej metody zniszczenia. W artykule przedstawiono różne sposoby oznaczania grzybów pleśniowych (analiza obecności ergosterolu, obrazy mikroskopowe SEM, pomiary bioluminescencji, bezwzorcowa mikroanaliza rentgenowska EDS, określenie odczynu pH).

BIBLIOGRAFIA

- [1] Charkowska A., Zanieczyszczenia w instalacjach klimatyzacyjnych i metody ich usuwania, Wydawnictwo IPPU MASTA, 2003
- [2] Gutarowska B., Ergosterol jako wskaźnik zanieczyszczenia grzybami strzępkowymi surowców roślinnych, Praca doktorska, Politechnika Łódzka, 1999
- [3] Gutarowska B., Cichocka A., Zastosowanie metody oznaczania ergosterolu do szybkiej oceny zanieczyszczenia grzybami na różnych etapach produkcji papieru, Przegląd Papierniczy nr 1/2010, str. 45–48

- [4] Gutarowska B., Smok A., Badania skuteczności wykrywania grzybów strzępkowych w powietrzu, Materiały konferencyjne, Problemy jakości powietrza wewnętrznego w Polsce 2005, pod red. T. Jędrzejewskiej-Ściabak i J. Sowy, Wydział Inżynierii Środowiska PW, Warszawa, 2006
- [5] Floryszak-Wieczorek J., Zbigniew Górski Z., Arasimowicz-Jelonek M., Functional imaging of biophon responses of plants, Eur J Plant Pathol, 130, 2011, str. 249–258
- [6] Górski Z., Łowińska-Kluge A., Horbik D., Wykorzystanie zjawiska bioluminescencji do określania stopnia porażenia budowli czynnikami biotycznymi, Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, seria: Monografie nr 7, Ochrona budynków przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem, tom XI, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011, str. 57–62
- [7] Horbik D., Biodeterioracja a trwałość elewacji o różnym przeznaczeniu, Rozprawa doktorska, Poznań, 2013
- [8] Horbik D., Łowińska-Kluge A., Górski Z., Stanisław E., Zgola-Grześkowiak A., Microwave- assisted extraction combined with high performance chromatography – tandem mass spectrometry for diagnosis of fungal contamination in building materials, Journal of Brazilian Chemical Society, 2013
- [9] Kaiser K., Wolski A., Kontrola czystości mikrobiologicznej powietrza, Technika chłodnicza i klimatyzacyjna 4/2007, str. 158–162
- [10] Koziróg A., Żakowska Z., Ergosterol w ocenie stanu zagrzybienia powierzchni, Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, seria: Monografie nr 7, Ochrona budynków przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem, tom XI, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011, str. 57–62
- [11] Łowińska-Kluge A., Górski Z., Obrazowanie luminescencji jednym z narzędzi służących do określania skuteczności zabezpieczeń budowli przed korozją biologiczną, Materiały budowlane 5/2012 ISSN 0137-2971, Warszawa, str. 73–74
- [12] Łowińska-Kluge A., Józwiak K., Jasiczak J., Improvement of Concrete Resistance to Acid by Microstructure Modification, ICCE/7 Denver, Seventh Annual International Conference on Composites Engineering, July 2–8 2000, Ed. David Hui, str. 381–382
- [13] Matkowski K., Ocena obecności grzybów w budynkach, Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, seria: Monografie nr 7, Ochrona budynków przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem, tom XI, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011, str. 73–74
- [14] Nielsen K. F., Madsen J. O., Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas chromatography – tandem mass spectrometry, J. of Chromat. A, 898, 2000, str. 227–234
- [15] Piotrowska M., Żakowska Z., Wilgotność jako parametr warunkujący rozwój czynników odpowiedzialnych za korozję biologiczną, Polskie Stowarzyszenie Mykologów Budownictwa, seria: Monografie nr 7, Ochrona budynków przed wilgocią, korozją biologiczną i ogniem, tom XI, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2011, str. 89–95