

影响城市混凝土结构的微菌代谢活动

尤金·斯特罗加诺夫, 维克托·科兹洛娃, 罗迪翁·伊林斯卡娅, 加琳娜·萨加德耶夫, 奥尔加·奥库内夫
隶属机构: 俄罗斯建筑工程大学

摘要: 混凝土对微生物破坏作用的抵抗力被认为是衡量其耐久性的指标, 并且越来越成为一个重要问题。我们的研究重点是从俄罗斯鞑靼斯坦喀山市前军事医院内壁表面分离的微菌对广泛用作城市房屋建筑材料的混凝土标本进行生物降解。真菌群落由9株青霉菌、6株曲霉、2株木霉和1株链格孢属组成。首先, 我们确定了两种主要分离物, 烟曲霉和短青霉, 并根据径向生长速率、对混凝土细菌栖息地的拮抗活性和有机酸的产生来表征它们的破坏性。我们已经证明了五个测试品牌的高强度混凝土在生物接受性方面存在差异。真菌侵袭后混凝土抗压和抗弯能力的变化记录在趋势水平, 这主要是由于在俄罗斯国家标准推荐的测试中混凝土暴露于真菌破坏剂的时间很短。最后, 通过使用扫描电子显微镜, 我们主要表明真菌对混凝土的定殖包括它们渗透到混凝土的厚度和裂缝中的萌发。元素分析表明, 与未经真菌处理的样品相比, 在液相中真菌生长后, 钙含量降低了约41%, 而表层生长则降低了32%。

关键词: 微菌; 代谢活动; 混凝土

Metabolic Activity of Micromycetes Affecting Urban Concrete Constructions

Eugene Stroganov, Viktor Kozlova, Rodion Ilinskaya, Galina Sagadeev, Olga Okunev

Affiliation: University of Architecture and Engineering, Russia

Abstract: Concrete resistance to the destructive action of microorganisms is considered as a measure of its durability and is increasingly being raised as an important issue. We focused our study on the biodeterioration of concrete specimens widely used as a building material of urban houses by micromycetes isolated from the inner wall surface of the former military hospital in Kazan city, Tatarstan, Russia. Fungal community consists of 9 *Penicillium* isolates, 6 *Aspergillus*, 2 *Trichoderma*, and 1 isolate of *Alternaria*. First, we have identified two dominant isolates, *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum*, and characterized their destructive properties according to the radial growth rate, antagonistic activity towards bacterial habitants of concrete, and production of organic acids. Then, we have demonstrated that five tested brands of high-strength concrete differ in bio receptivity. The alterations in concrete resistances to compression and flexure after fungal attack were recorded at the trend level, mainly due to a short exposure time of concrete to fungal destructors in tests recommended by national Russian standard. Finally, using scanning electron microscopy we have shown that colonization of concrete by the dominant fungi includes their penetration into the thickness of concrete and germination in cracks. Elementary analysis revealed the decrease of calcium content on about 41% after fungal growth on the concrete in liquid phase and on 32% by superficial growth in comparison with the samples without fungal treatment.

Keywords: Micromycetes; metabolic activity; concrete

引言:

混凝土, 波特兰水泥和水的混合物, 骨料, 在某些情况下, 外加剂是一种随着时间的推移获得强度的建筑材料。传统上称为微生物的混凝土的生物变质。建筑材料生物劣化的原因是三个主要过程: 机械过程、同化

过程(建筑材料是微生物的营养和能量来源)和异化过程(建筑材料与微生物的侵袭性代谢物的相互作用)。微生物对混凝土结构的作用可根据其对混凝土表面、混凝土基体以及裂缝和裂缝扩展的影响进行分类。微生物代谢物的化学作用补充了生长效应, 导致混凝土材料的物

理化学性质发生变化并加速破坏过程。微生物对混凝土的影响主要通过侵蚀混凝土表面而发生。这会导致混凝土孔隙率增加,出现裂缝、碎屑和其他损坏,最终显著降低这种材料的使用寿命。微生物在混凝土表面生长的有利条件是湿度增加(即在60%和98%之间)、干湿循环、冻融的长期循环、高浓度的二氧化碳、高浓度的 Cl^- 或 SO_4^{2-} 离子和少量酸。混凝土结构的生物劣化被证明是一种普遍现象;然而,各种微生物种群和机制被证明在不同的位置发挥不同的作用。我们的研究重点是广泛用作城市房屋建筑材料的混凝土标本的生物降解。

许多建筑物被认为因微生物引起的混凝土破坏而受到不同程度的破坏。直到今天,对于微生物侵袭混凝土结构的破坏程度和严重程度、作用机制和有效的补救技术,还没有明确的认识。有一组调查描述了热带沿海和海洋地区的混凝土生物退化,库姆斯,但对位于温带大陆气候区的城市的这一过程知之甚少。大城市中混凝土的生物腐蚀最常在建筑地基和墙壁中检测到。考虑到城市建筑物没有直接接触地下水和冬季低温,非孢子形成和孢子形成但嗜热的硫酸盐还原细菌(*Desulfotomaculum*属)在房屋破坏中的作用很小。该领域的基本破坏剂是合成广谱有机酸的微菌,这些有机酸对混凝土具有极强的腐蚀性。此外,次级代谢物(抗生素、霉菌毒素)的产生使它们在混凝土定植方面优于细菌。

我们的研究旨在分离和识别生长在喀山市(俄罗斯鞑靼斯坦共和国)旧建筑物混凝土墙上的火焰真菌,并根据生长速率和酸产量的测量来表征它们的破坏性,以用于未来的恶化评估由它们引起的细粒混凝土的水平。应用微生物学方法与标准方法相结合的综合方法来确定建筑结构的强度,我们证明了混凝土强度降低与真菌代谢活动水平之间的联系,真菌代谢活动的主要标志是有机酸的产生、径向生长速度和拮抗活性。

材料和方法

一、微菌纲

从喀山市(俄罗斯鞑靼斯坦共和国)前军事医院的内壁表面分离出微观真菌。用无菌棉签处理10个不同部位可见微菌生长的混凝土墙表面,然后将其放入装有5 ml 无菌水的管中。从那里,将10个100 ml 样品(一式三份)应用于培养皿中的固体 Czapek-Dox 培养基,在30℃下孵育5天。用显微镜分析菌落的形态。分离菌总数为18株。以曲霉属和青霉属的优势真菌为研究对象,对其破坏性进行了研究。对于微菌的培养,使用液

体和琼脂化的 Czapek-Dox 培养基(g/l): $\text{NaNO}_3 - 2.0$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.0$; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} - 0.5$; 氯化钾 - 0.5; $\text{FeSO}_4 - 0.01$; 蔗糖 - 30.0; $\text{H}_2\text{O} - 1000$ 毫升。使用标准引物 ITS1 和 ITS 4 对分离株的 ITS (内部转录间隔区) 区域进行 Sanger 测序补充了显性真菌的显微鉴定。可变 ITS1 和 ITS2 序列位于小(SSU)和大之间的核糖体操纵子中分析了 5.8 S rRNA 基因周围的亚基(LSU)序列,并与从 MycoBank 和 GenBank 数据库下载的参考菌株进行了比较。

二、混凝土标本及其真菌处理

高强砂质混凝土样品 M 400、M 500、V 600、V 800 和 V 1000 制成尺寸为 160 × 40 × 40 mm 的梁形式。在基于波特兰水泥等级 PC400 和 PC500 (强度对应于 B30 和 B40 级) 和 B45、B60 和 B70 级混凝土的水泥砂浆的制造中,沙子的比例(0.5-0.25 毫米的比例对应于俄罗斯国家标准 GOST 8736-93) 和水泥是三比一。在基于波特兰水泥 PC500 的 B45、B60 和 B70 级混凝土(V 600、V 800 和 V 1000) 的制造中,添加了占水泥重量 0.5% 的 Melfux 2651 F 减水剂(巴斯夫建筑聚合物)。水/水泥比为 53/100。为了符号的通用性,以下我们对所有样品都使用术语“水泥”。混凝土的强度由拉丁字母“M”表示的标记和从 400 到 1000 的数字指定,具体取决于混合物中使用的水泥量,并以 kg/cm^2 表示抗压强度。将制备好的无菌光束置于用 70% 乙醇预灭菌的容器中。用无菌培养基填充容器,并加入优势微菌的孢子(105 /ml)。对照容器用无菌 Czapek-Dox 培养基填充,未接种。高达 2 cm 的梁的下部浸入介质中;上部在密闭容器的潮湿气氛中,在 30℃ 下孵育 28 天。

三、有机酸分析

使用高效液相色谱仪 Flexar 分析了在液体 Czapek-Dox 培养基上生长 5 天直至指数期结束的 18 种真菌分离物的培养液中分泌的有机酸的产生。有机酸的分离在装有 3mm 颗粒的 Brownlee Analytical C18 (150 × 4.6 mm) 色谱柱中进行。使用由 10 mM KH_2PO_4 溶液组成的系统在室温下以线性梯度进行洗脱,该溶液用正磷酸调节至 pH 2.4 (洗脱液 A) 和乙腈 (洗脱液 B)。流动相的流速为 1 毫升/分钟。使用紫外检测器在 210 nm [12] 处识别峰。作为标准,使用酸溶液(g/l): 草酸(0.15)、酒石酸(0.35)、苹果酸(0.5)、乳酸(0.35)、柠檬酸(0.5) 和乙酸(0.15)。

四、微菌径向生长速率的测定。

真菌的快速生长速度与作为初级代谢产物的有机酸

的产生有关。为了找到最活跃的真菌分离物，进行了微生物径向生长速率（RGR）的测定。每 24 小时在 8 个相互垂直的方向测量琼脂培养基上分离物的菌落直径；在每个时间点取算术平均值。

五、抗活性测定

稳定生长期产生的次级代谢产物不直接参与真菌的正常生长发育，但它们在与其他生物的生态相互作用中发挥着重要作用。为了表征真菌产生一些有助于抑制混凝土上细菌群落生长并间接影响混凝土破坏的侵袭性次生代谢物的能力，通过琼脂块法测定了微生物对分离的细菌群落的拮抗活性。将混凝土表面的冲洗水加入 LB 培养基中培养 24 小时，得到混合菌培养物。在 Czapek-Dox 琼脂上培养微生物分离物 A2 和 P4 10 天。10、用无菌塞钻切开有生长真菌的琼脂块，转移到 Czapek-Dox 琼脂表面，新鲜接种细菌培养物，28℃培养 2 天。细菌生长抑制区的大小。

六、混凝土稳定性测定

抗压强度和抗弯强度是通过在特殊液压机中破坏混凝土试样来测量的，计算方法是破坏载荷除以横截面积。如前所述，在暴露于生长的菌丝体之前和之后测试了抗压和抗弯强度。

七、扫描电子显微镜

在显微镜样品涂有金/钼之前，洗涤混凝土样品，用戊二醛固定（如果发现真菌生长），用乙醇脱水并在室温下干燥。通过扫描电子显微镜，可以进行元素组成的测定和混凝土表面结构的可视化。在 5 keV 的加速电压下分析表面形态。元素分析在 20 keV 的加速电压和 9 mm 的工作间隔下进行，同时使用了一套 Aztec 程序标准（X 射线微量分析的参考标准“注册标准号 8842”）。

八、统计数据

使用标准计算机程序 Excel 7.0 对数据进行数学处理。所有实验至少重复三次。如果数据组的均方根偏差不超过 12%，则认为该数据组是同质的。

讨论

一、建筑物中的隔离物与生物稳定性测试建议中列出的不同

城市建筑混凝土破坏的原因主要是不正确的运行条件，而不是大气降水的自发效应。缺乏室内通风、高湿度、大量人群以及最终的长时间运行都会导致用于住宅建筑内部地板的混凝土结构缓慢但永久的破坏。这就是为什么我们的研究旨在识别在建筑物的实际运行条件下破坏混凝土的微生物。重要的是要确定建筑中使用的

不同类型的混凝土如何容易受到生物降解的影响，以及确定它的标准测试如何反映真实情况。迄今为止，有超过 200 种不同的方法来测试建筑材料的生物稳定性。除国际标准外，还有各个国家的国家标准（美国为 STD 141C/6271/2-86；英国为 BS 1133，德国为 DIN 53739-84，法国为 NF X 41-514-81；JIS Z 2911-日本为 87，俄罗斯为 GOST 9.048-89）。GOST 9.048-89 推荐使用 8 种不同的真菌（黑曲霉、土曲霉、出芽短梗霉、拟青霉、绳状青霉、赭色青霉、短柄短孢菌和绿色木霉）来测试混凝土强度的变化。根据我们的数据，从旧建筑墙壁上分离出的物种与推荐的物种不同。这意味着生物去污剂微生物对于它们居住的每个特定建筑物都是特殊的。本研究分离的微生物主要属于曲霉属和青霉属。对两种更具攻击性的分离物 *A. fumigatus* A2 和 *P. brevicompactum* P4 进行了物种鉴定，由于初级代谢物合成水平高（由 *A. fumigatus* A2 为 77.74 mg/l，而 *P. brevicompactum* P4 为 30.47 mg/l），并且由于与生长缓慢的微生物相比，高生长速率提供了在生态位中定居的优势。在 42 周期间，在涂漆建筑物上检测到的主要真菌属是链格孢属、弯孢属、表球菌属、蠕孢属、腔菌纲（主要是 *Pestalotia/Pestalotiopsis*）、红曲霉属、黑孢属、*Aureobasidium* 和枝孢属。医院环境（Centre F. Baclese, Normandy, France）中的主要菌株列表根据其在体外产生霉菌毒素的频率、浓度水平和/或能力编制如下：*A. fumigatus*、*A. melleus*、*A. niger*、*A. versicolor*、*Cladosporium herbarum*、*Purpureocillium lilacinum* 和 *P. brevicompactum*。在这个列表中有两个代表（*A. fumigatus* 和 *P. brevicompactum*），我们也从喀山老医院的墙壁上隔离了它们。因此，可以得出结论，从建筑物混凝土墙中分离出的生物去污剂真菌与从油漆表面分离出的真菌完全不同。

二、有机酸光谱在混凝土生物劣化中起重要作用。

地质活性真菌的不利影响包括天然和合成材料、基于岩石和矿物的建筑材料（例如混凝土）、文化遗产、金属、合金和相关物质的生物降解。影响特定建筑物中混凝土破坏的三个关键生物学因素：存在具有高增长率并因此在社区中占主导地位的真菌菌株（i）；大量生产的有机酸，尤其是柠檬酸，其与钙的盐不会形成保护膜，但会引起微裂纹加深（ii）；某些真菌菌株具有显著的拮抗活性，使它们能够取代居住在混凝土物品中的细菌群落（iii）由于柠檬酸的化学性质，它具有与混凝土基体的碱性成分，反应生成柠檬酸钙的能力。柠檬酸与顶层氢氧化钙的化学反应会腐蚀混凝土表面。只要存在过量

的酸，柠檬酸钙就会保持可溶性。随着酸的消耗，溶解度降低，柠檬酸钙以固体形式沉淀出来，导致微裂纹加深。所有提到的因素都无法与众所周知的污水中硫酸盐还原细菌的破坏活性相提并论，其中硫化氢形成的硫酸溶解固化水泥中的碳酸盐并导致强度损失，并产生对混凝土有害的硫酸盐。它们也至少部分不同于影响亚热带气候中建筑物的可变生物因素。今天，已经检查了混凝土结构的生物污垢和生物劣化，包括地下结构、污水系统、海上结构和废水处理系统。对彩绘建筑和文化遗物的生物降解给予了极大的关注。不幸的是，在温带和大陆性气候下，没有足够的关于住宅建筑混凝土项目的生物劣化的信息。从这个角度来看，我们的工作提供了第一个表征真菌在这些条件下居住在混凝土中的破坏性的数据。

三、钙的流失导致混凝土强度下降。

众所周知，钙的释放和酸的产生是影响混凝土稳定性的重要过程。我们观察到 *P. brevicompactum* P4 在混凝土上生长后钙含量的下降，与表面生长相比，液相生长的钙含量更高。镰刀菌属物种引起了混凝土的相同变化。空气中的二氧化碳与混凝土中的氢氧化钙发生反应，在没有被真菌感染的混凝土表面上显示出 CaCO_3 的非生物形成。在孔系统中沉淀出稳定的 CaCO_3 。碳化有两个作用：它增加了混凝土的机械强度，但它也降低了碱度，这为真菌的生长创造了有利的条件，导致混凝土中钙的流失。本研究中鉴定的 15 种真菌分离物产生草酸，因此形成草酸钙，在混凝土表面形成保护层，有助于产生这种酸的积极影响。产生或多或少可溶性钙盐的乳酸和苹果酸的分离物数量较少表明它们在降低 pH 值中的普遍作用，这促进了真菌的未来发展。柠檬酸可归因于对混凝土有负面影响的试剂，因为柠檬酸钙沉淀会增加微裂纹的尺寸。从有关真菌酸生产的结果中可以得出的主要结论是各种酸对混凝土稳定性的影响不明确。鉴于不同菌株的酸谱不同，如果不研究特定析构函数的特性，很难预测结构损伤。例如，对带有藤壶的海洋级混凝土的研究表明，藤壶不会增加但可能会通过缓冲近地表热循环和减少盐离子进入来降低岩石和混凝土的机械破坏率。细菌生物矿化有助于观赏石的保护巩固。当然，真菌不能与生物保护剂有关，但它们对混凝土的影响并不总是强制性的负面影响，并且取决于某些酸的产生。在这里，我们发现推荐用于评估混凝土生物损伤的标准测试在趋势水平上表征了不同混凝土标记的不同损伤。然而，与其他混凝土品牌相比，混凝土试样 V 1000 的抗压和抗弯强度保持较少。如果我们关注这些数据，混凝土样品中

较高的水泥含量会增加其对真菌危害的抵抗力。结果表明，混凝土抵抗盐酸破坏影响的能力取决于水泥的品牌和用量。由于微生物引起混凝土腐蚀过程的引发和加剧，因此测试时间可能不足以检测混凝土强度特性变化的更显著差异。

四、真菌毒素会导致病态建筑综合症

最后，必须指出的是，产毒真菌对建筑材料的定植引发了居住者随后接触雾化霉菌毒素的问题。*P. brevicompactum* 常见于室内空气中并在研究中分离出来，已知会产生霉菌毒素。霉酚酸和赭曲霉毒素 A 具有致癌、致畸和肾毒性的潜力，在人体血液中的半衰期较长。大部分雾化毒性负荷存在于大小对应于孢子或菌丝体碎片的颗粒中。然而，在比孢子还小的颗粒上也发现了一些毒素，这些颗粒很容易被吸入，并能深入人体呼吸道，导致病态建筑综合症，这被认为是城市绝大多数人口的多因素健康问题。具体生物退化研究本身的相关性及其对环境和人类健康的影响正在不断增加。

结论

广泛用于住宅城市建筑的混凝土的生物劣化现在已成为一个重要的环境问题。首先，房屋的真菌恶化在运营期间增加并且难以停止。其次，必须考虑其对人类健康的影响，据统计，城市居民大约 95% 的时间都在室内度过。在这里，我们描述了旧城建筑中主要真菌居民的代谢活动对混凝土生物劣化的贡献，包括径向生长速度、拮抗活性和有机酸的产生。我们已经证明真菌生长会导致混凝土表面的钙释放。如果混凝土表面位于液相（41%）与与空气接触的表面（36%）相比，钙的减少量更高。随着钙含量的降低，混凝土试件的抗压强度和抗弯强度随混凝土品牌的变化而变化。暴露于生长的曲霉和青霉分离物的混凝土样品在 28 天内的稳定性下降了约 1%。为了检测由真菌引起的混凝土试样的真实个体变化，推荐标准测试的持续时间必须延长。城市住宅混凝土生物劣化问题在今天已不能算是头等大事，但时间因素提升了它的价值。特别强调可变的真菌破坏活动、复杂的机制以及正确分析混凝土劣化的系统都是需要进一步调查的领域。

参考文献：

- [1]G. Y. Yakovleva, A. R. Zajnullina, V. F. Stroganov et al., "Assessment of biodamage resistance of various concrete grades," International Journal of Pharmacy and Technology, vol. 8, no. 4, pp. 24291 - 24299, 2016.
- [2]V. F. Stroganov and E. V. Sagadeev, Biodeterioration

of building materials, *Construction Materials*, Moscow, Russia, 2015.

[3]S. L. Goss, K. A. Lemons, J. E. Kerstetter, and R. H. Bogner, “Determination of calcium salt solubility with changes in pH and P,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 59, no. 11, pp. 1485 – 1492, 2007.

[4]M. Ijdo, N. Schtickzelle, S. Cranenbrouck, and S. Declercq, “Do arbuscular mycorrhizal fungi with contrasting life–history strategies differ in their responses to repeated defoliation?” *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 72, no. 1, pp. 114 – 122, 2010.

[5]M. A. Shirakawa, C. C. Gaylarde, P. M. Gaylarde, V. John, and W. Gambale, “Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide,” *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 39, no. 2, pp. 165 – 173, 2002.

[6]N. Heutte, V. Andr´e, C. Dubos Arvis et al., “Assessment of multicontaminant exposure in a cancer treatment center: a 2–year monitoring of molds, mycotoxins, endotoxins, and glucans in bioaerosols,” *Environmental*

Modeling & Assessment, vol. 189, no. 1, 2017.

[7]M. Gonzalez–Munoz, “Bacterial biomineralization applied to the protection–consolidation of ornamental stone: current development and perspectives,” *Coalition*, vol. 15, pp. 12 – 18, 2008.

[8]J. J. Sokołowska and P. Woyciechowski, “Effect of acidic environments on cement concrete degradation,” in *Proceedings of the third International Conference on Sustainable Construction Materials and Technologies*, Kyoto Research Park, Kyoto, Japan, 2013.

[9]M. Ndagijimana, C. Chaves–L’opez, A. Corsetti et al., “Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 127, no. 3, pp. 276 – 283, 2008.

[10]L. Kupski, M. Freitas, D. Ribeiro, E. B. Furlong, and E. Fernandes, “Ochratoxin A activates neutrophils and kills these cells through necrosis, an effect eliminated through its conversion into ochratoxin,” *Toxicology*, vol. 368–369, pp. 91 – 102, 2016.