

УДК 57.083.1:620.18

Г.М. Бухарев¹

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЦИДОВ

DOI: 10.18577/2071-9140-2016-0-S2-22-27

Надежность изделий техники во многом определяется их стойкостью к воздействию внешней среды, в том числе к воздействию микроорганизмов.

Для защиты материалов разрабатываются различные биоцидные средства, в том числе так называемые фунгициды. Для проверки свойств фунгицидов в России применяется ГОСТ 9.803, основанный на методе сравнительного анализа кинетики наращивания биомассы при серийном разведении фунгицидов. Проведен подробный анализ ГОСТ 9.803 и предложено применение экспресс-метода серийных разведений. Показана эффективность метода, определены эффективные концентрации четырех фунгицидных средств.

Ключевые слова: метод серийных разведений, биоциды, фунгициды, испытания, эффективность, ГОСТ 9.803.

Equipment reliability is determined in many aspects by its resistance to environmental influence including microbiological stability.

Different biocides, including so called fungicides are developed for materials protection. To test fungicides properties the national standard GOST 9.803 based on a comparative kinetics analysis method of fungal biomass growth in fungicides serial dilution is used in the Russian Federation. The detailed analysis of GOST 9.803 is performed and a serial dilution method based on CLSI standards is offered. The method efficiency is shown and effective concentrations of four fungicides are determined.

Keywords: serial dilution method, biocides, fungicides, research, effectiveness, national standart GOST 9.803.

¹Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт авиационных материалов» Государственный научный центр Российской Федерации [Federal state unitary enterprise «All-Russian scientific research institute of aviation materials» State research center of the Russian Federation]; e-mail: admin@viam.ru

Введение

Работа выполнена в рамках реализации комплексного научного направления 17.7. «Лакокрасочные материалы и покрытия на полимерной основе» («Стратегические направления развития материалов и технологий их переработки на период до 2030 года») [1].

Надежность изделий техники во многом определяется их стойкостью к воздействию внешней среды, естественной составляющей которой являются микроорганизмы (микроскопические грибы, бактерии, дрожжи и др.) [1, 2]. Микроорганизмы-деструкторы (биофактор, биодеструкторы), воздействуя на объекты техники, вызывают повреждения последних (биоповреждение, микробиологическое повреждение): изменение структурных и функциональных характеристик вплоть до разрушения [1, 3–5]. Биодеструкторы способны быстро адаптироваться к различным материалам как к источникам питания, условиям внешней среды и к средствам защиты. В связи с этим практически все известные материалы, особенно горюче-смазочные материалы (ГСМ) [6–9], подвержены биоповреждению. Ущерб от него оценивается в 2–3% объема всей промышленной продукции [9–13].

Для защиты материалов разрабатываются различные биоциды. Биоциды, которые предназна-

ны для подавления грибов, называются фунгицидами [3, 8, 14, 15]. Некоторые известные ингибиторы коррозии, такие как 1,2,3-бензотриазол (БТА), 3-аминотриазол (АТ), катамин АБ [3, 5, 16–19], обладают биоцидной активностью разной степени [20].

Для проверки свойств биоцидов проводят различные испытания, в том числе регламентированные различными нормативными документами. Так, в Российской Федерации эти испытания регламентирует ГОСТ 9.803–88 [3]. В американской системе испытаний материалов (ASTM) такие испытания регламентируются целым рядом нормативных документов: ASTM D4445-10, ASTM E1259-10, ASTM E1428-99(2009), ASTM E1839-07, ASTM E1891-10a, ASTM E2149-10, ASTM E2783-11, ASTM E645-07, ASTM E723-07, ASTM E875-10, ASTM E979-09 [21–31]. Практически во всех американских стандартах используется метод серийных разведений, принципиальное отличие которых заключается в различных применяемых микроорганизмах, а также в количестве и степени разведения биоцидов, предназначенных для испытаний.

Особо следует отметить также то, что американский стандарт ASTM E1259-10 [22] регламентирует испытания биоцидов в легкокипящих го-

рючих жидкостях, к которым, например, относятся авиационные топлива. К сожалению, в отечественных стандартах ГОСТ 9.023 [32] и ГОСТ 9.052 [33] не предусмотрена возможность испытаний биоцидов с различной концентрацией. Нормативы предусматривают испытания топлив и масел с присадками (как есть) в сравнении с уже известными по своим свойствам ГСМ.

В отечественном ГОСТ 9.803 [3] при испытании водорастворимых биоцидов предлагается оценка эффективности биоцидов по накоплению биомассы при общей продолжительности испытаний 42 сут. Такой подход позволяет объективно оценить воздействие исследуемых препаратов на микроорганизмы и, самое главное, выявить совсем небольшие отличия по мере воздействия в зависимости от воздействующей концентрации. Эти отличия выявляют по статистически достоверным различиям наработки биологической массы. Однако методика, предлагаемая в ГОСТ 9.803, имеет ряд спорных положений.

Во-первых – это требование длительной наработки биологической массы продолжительностью до 42 сут. Затем необходима достаточно кропотливая работа по дальнейшей (после наращивания биомассы) пробоподготовке, которая включает в себя извлечение биомассы из посуды для выращивания культур и высушивания до постоянной сухой массы. ГОСТ также никак не определяет некоторые условия культивирования, а именно – должно ли это быть статичное культивирование или это должна быть глубинная культура при постоянном перемешивании, например на качалочных или вращающихся платформах, так как такое культивирование обеспечивает равномерный массоперенос как питательных веществ, так и испытываемых биоцидов, что, в свою очередь, может как изменить результаты испытаний в принципе, так и просто сократить время испытаний. Дополнительно, при статичном культивировании, достаточно часто развивающаяся на поверхности жидкой питательной среды культура проявляет так называемую трофность к твердой поверхности, на которую она опирается. Выглядит это как распластанный по внутренней поверхности колбы мицелий на границе фазового раздела питательной среды и воздуха, и изъять полностью такой мицелий бывает довольно проблематично. Таким образом, сложность пробоподготовки может отразиться на массе полученного мицелия, особенно это значимо при сильно угнетенном росте, когда даже небольшие погрешности могут сказаться на конечном результате оценки фунгицида.

Во-вторых – это требования ГОСТ 9.803 к применяемым культурам микроорганизмов. Выделим несколько аспектов: дискуссионен сам выбор тех культур, которые предлагаются; сомнительно предложение вносить смешанную культуру, а также требует более тонкой проработки начало испытаний биоцидов в зависимости от

фазы роста микроскопических грибов и их физиологической активности.

Так, видовой состав, вносимый в составе суспензии, определяется тем, для защиты каких материалов предназначаются фунгициды, и регламентируется ГОСТ 9.048, ГОСТ 9.049, ГОСТ 9.050 и ГОСТ 9.802 [34–37]. Во всех указанных ГОСТ предполагается использовать только так называемые плесневые грибы как наиболее жизнестойкие. Это полностью оправдано для испытаний тканей по ГОСТ 9.802 [37]. Но при испытании фунгицидов для полимерных материалов и лакокрасочных покрытий [35, 36], особенно тех, для которых потом возможен контакт с ГСМ, вызывает удивление отсутствие испытаний фунгицидов к дрожжевым видам грибов, так как в условиях недостаточного аэрирования поверхности испытываемого материала, которые как раз характерны для загрязнения поверхности ГСМ, дрожжевые формы получают преимущество как приспособленные к развитию в аноксигенных условиях [38]. Эти возражения автора больше относятся не к ГОСТ 9.803, а к упомянутым ранее ГОСТ 9.048, ГОСТ 9.049, ГОСТ 9.050 и ГОСТ 9.802 [34–37].

Следует рассмотреть также требование вносить смешанную культуру. По результатам испытаний выявлено, что при смешанном культивировании (например, на твердых богатых питательных средах) плесневые грибы проявляют мощный антагонизм по отношению друг к другу, особенно темноокрашенные виды, такие как *Aspergillus niger* van Tieghem и *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. Некоторые расы второго вида проявляют микопаразитические свойства, т. е. прямым образом угнетают остальные микроскопические грибы. Проблема антагонизма для каждого вида микроскопического гриба решается при испытании фунгицидов отдельно – как это реализовано в стандартах американского Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)) – бывший Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам (The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)) – например, в «Методы испытаний чувствительности плесневых грибов к фунгицидам методом разведений в жидких питательных средах» [39]. При решении проблемы антагонизма отдельным культивированием для каждого вида гриба при наращивании биомассы на протяжении 42 дней в колбах, проведение такого рода испытаний становится достаточно сложным мероприятием, особенно – для маломощных испытательных лабораторий.

При рассмотрении аспектов начала испытаний биоцидов в зависимости от фазы роста микроскопических грибов, необходимо учитывать тот факт, что чувствительность грибов к фунгицидам сильно меняется – будет ли это в фазе прораста-

ния споры или при воздействии на уже сформированный мицелий [39, 40]. В данном случае подход к проверке фунгицидов определяется тем, как впоследствии будут применяться фунгициды: будет ли это обработка поверхностей материалов в составе уже готовых изделий или биоциды будут вноситься в состав самого материала [15]. Подход в использовании микромицетов, находящихся в разной фазе своего развития, накладывает отпечаток на приемы подготовки суспензий со спорами. При испытании воздействия фунгицидов на споры, целесообразно добиваться максимального содержания именно спор и уменьшать количество обрывков взрослого мицелия. Обычно это достигается методом смыва с поверхности зрелого, спороносящего мицелия. Следует подчеркнуть, что в ГОСТ 9.048, на который ссылается ГОСТ 9.803 в части приготовления суспензий, предлагается использовать для этих целей перенос спор посредством посевной иглы или бактериальной петли. Но продуктивность такого метода крайне низкая, к тому же при этом очень часто происходит захват мицелия.

В-третьих – это сам методический подход к проверке биомассы в зависимости от концентрации того или иного фунгицида. На практике обычно требуется нахождение минимальной эффективной биоцидной концентрации [22, 14]. Для решения этой проблемы совершенно нет необходимости проводить тонкую и кропотливую работу по наработке биомассы и выявлению статистически значимых отличий для каждой концентрации. Такая задача подходит для научно-исследовательских работ, но не для обычных испытаний. В работе испытательной лаборатории достаточно найти ту пограничную концентрацию, выше которой развитие грибов (плесневых или в дрожжевой форме, или даже бактерий) полностью отсутствует. Задача – найти предел концентраций, при которых развитие происходит в угнетенном состоянии, что встречается достаточно редко. При нахождении минимальной эффективной биоцидной концентрации, проверка наличия жизнеспособных пропагул микроорганизмов сводится обычно к простому микроскопированию и/или к специальному окрашиванию так называемыми витальными красителями, которые окрашивают структуры, характерные для живых организмов (ядра) – например, флуоресцентными красителями: DAPI (4'-6'-диамидин-2-фенилиндол) [40], Calcofluor White M2R [41] и резаурином [14]. В идеальном случае такие задачи решаются так называемым методом микроразведений [38], подразумевающим использование малых объемов культуральной среды с витальным красителем в серии с различными концентрациями исследуемого фунгицида.

В-четвертых – это использование гидрогелевых подложек для водонерастворимых фунгицидов, что частично решается применением иных

растворителей – например, диметилсульфоксида, этилового спирта или полиэтиленгликоля [38].

Таким образом, перспективным направлением развития испытаний фунгицидов по единой системе защиты от коррозии и старения следует считать: отказ от наращивания биомассы в качестве самоцели, кардинальное уменьшение времени инкубирования, переход на испытание отдельных видов микромицетов, применение специфических красителей. Такие методические подходы позволят как снизить трудоемкость метода, так и сократить продолжительность испытаний.

Цель данной работы – исследование эффективности свойств биоцидов методом серийных разведений и нахождение минимальной эффективной биоцидной концентрации.

Материалы и методы

Согласно ГОСТ 9.803 п. 1.1 [3] для проведения испытаний по ГОСТ 9.048 подготовлена жидкая питательная среда Чапека–Докса в объеме 5000 мкл на каждую повторность и внесена в стерильную пробирку объемом 20 000 мкл. В каждую пробирку с питательной средой вносили фунгициды в объемах, достаточных для достижения расчетных концентраций.

По ГОСТ 9.048 [34] также подготовлена stockовая споровая суспензия трех видов грибов – использовали зрелые свежeweделенные с материалов спороносящие культуры *Chaetomium globosum* Kunze, *Penicillium chrysogenum* Thorn и *Penicillium ochrochloron* Biourg в возрасте 14 сут с момента последнего посева. Споровую суспензию готовили методом смыва с поверхности колонии жидкой питательной средой Чапека–Докса, чтобы предотвратить неконтролируемое разбавление в случае, если бы для смыва применяли дистиллированную воду. Подсчет концентрации колонеобразующих единиц (КОЕ) проводили при помощи счетной камеры Горяева. Для каждого вида гриба готовили отдельную споровую суспензию. Затем каждую споровую суспензию вносили в питательную среду в равных объемах, достаточных для достижения в испытуемых и контрольных растворах общей концентрации 0,5 млн КОЕ/см³.

Испытания проводили в трехкратной повторности при положительном и отрицательном контроле. В качестве положительного контроля (K₂) использовали среду Чапека со спорами без биоцидов – для подтверждения жизнеспособности инокулята, в качестве отрицательного контроля (K₁) использовали среду Чапека без спор с максимальной применяемой в опыте концентрацией биоцида – для наглядности.

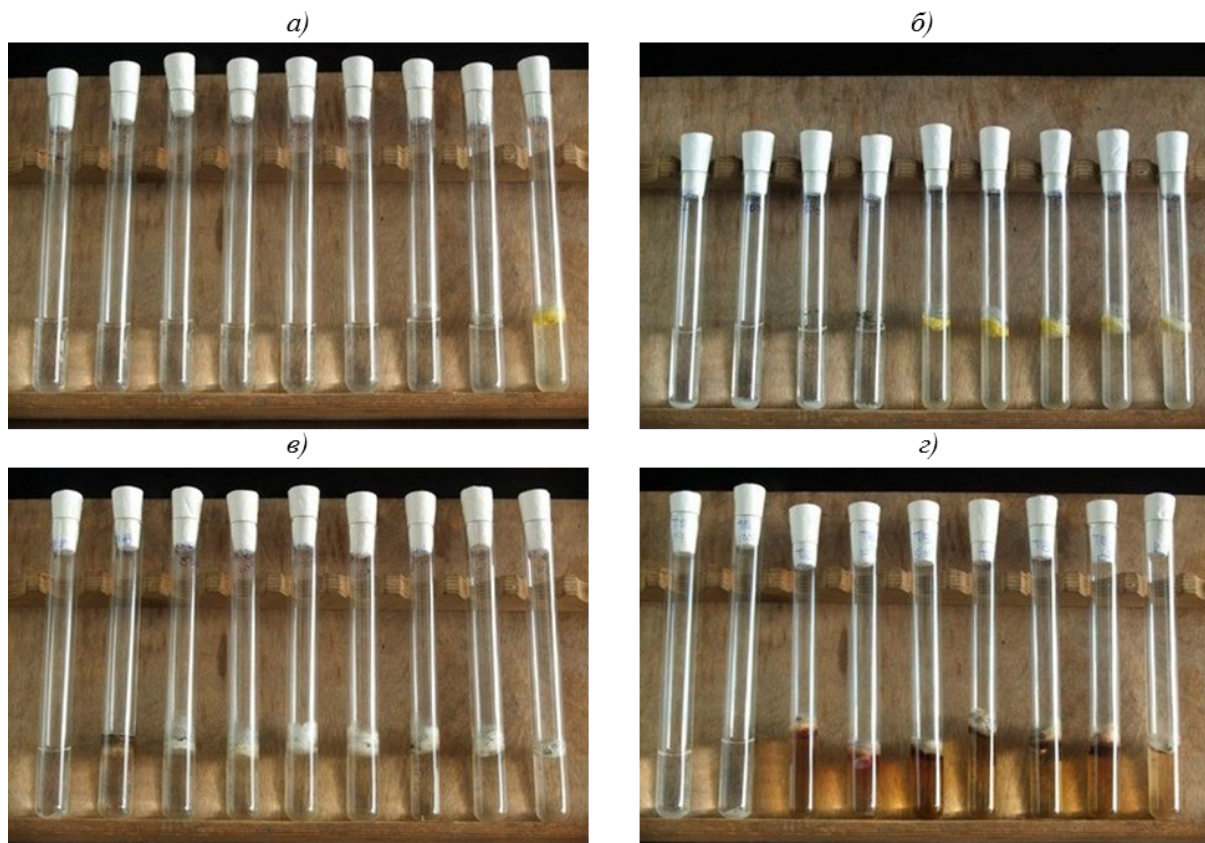
Для проверки работоспособности экспресс-метода выбраны четыре фунгицида: Биопаг, Комбатекс-4, Тезагран-био, Малкор В.

Приготовлена серия разведений растворов фунгицидных добавок с градиентом концентраций по действующему веществу, равным: 1; 0,2;

**Определение минимальной ингибирующей концентрации биоцидов
методом серийных разведений***

Условный номер образца	Концентрация, % (по массе)	Биопаг	Комбатекс-4	Тезагран-Био	Малкор В
1	K ₁ (1)	–	–	–	–
2	1	–	–	–	+
3	0,2	–	–	+	+
4	0,1	–	±	+	+
5	0,02	–	+	+	+
6	0,01	±	+	+	+
7	0,002	+	+	+	+
8	0,001	+	+	+	+
9	K ₂ (0)	+	+	+	+

* K₁, K₂ – среда Чапека соответственно без спор с максимальной применяемой в опыте концентрацией биоцида и со спорами без фунгицидов; – отсутствие развития; ± – развитие сильно подавлено; + – наличие развития.



Подавление роста и развития смеси микроскопических плесневых грибов, приготовленных по ГОСТ 9.048, в градиентных растворах биоцидов марок Биопаг (а), Комбатекс-4 (б), Малкор В (в) и Тезагран-Био (г) в жидкой питательной среде Чапека–Докса в течение периода инкубации 5 сут

0,1; 0,02; 0,01; 0,002; 0,001% (по массе) действующего вещества.

Инокулированные споровой суспензией растворы фунгицидных добавок (включая контрольные) инкубировали при температуре 30°C и влажности 90%. Инкубацию проводили на протяжении 5 сут с ежедневной оценкой роста и состояния суспензий спор.

Результаты

По окончании инкубации все растворы подвергали оценке, результаты которой приведены в таблице.

Испытывавшиеся фунгициды показали следующие результаты:

– Малкор В – не оказывает биоцидного эффекта в испытывавшихся концентрациях;

– Тезагран-Био – оказывает биоцидный эффект при концентрации 1% (по массе);

– Комбатекс-4 – оказывает фунгистатический эффект при концентрации 0,1% (по массе), биоцидный – при концентрации 0,2% (по массе);

– Биопаг – оказывает фунгистатический эффект при концентрации 0,01% (по массе), биоцидный – при концентрации 0,02% (по массе).

На рисунке представлены фотографии растворов фунгицидов после инкубации в течение 5 сут. Пробирки на всех представленных фотографиях расположены в порядке уменьшения концентрации (слева направо), крайние левые пробирки представлены контрольными пробирками с контролем K_1 , крайние правые – с контролем K_2 .

Следует отметить, что во всех случаях роста мицелия из споровой суспензии отмечается значительный объем мицелия, расположенного на поверхности пробирок (см. рисунок), причем попытка удалить его посредством игл для посева или препарирования удается только частично, что подтверждает тезис, изложенный во введении, о

сложности при отборе биомассы для дальнейшего ее анализа.

Обсуждение и заключения

Таким образом, в данной работе продемонстрирована принципиальная возможность оценки эффективности свойств биоцидов с помощью экспресс-метода.

Найдены минимальные эффективные концентрации биоцидов при испытаниях в растворах. Из четырех испытывавшихся фунгицидов самым эффективным оказался отечественный препарат Биопаг.

Отмечена сложность полного извлечения мицелия, расположенного на стеклянной поверхности пробирок.

По результатам экспресс-метода оценки эффективности фунгицидов целесообразно проведение полноценного сравнительного анализа данного экспресс-метода и методов, представленных в ГОСТ 9.803.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каблов Е.Н. Инновационные разработки ФГУП «ВИАМ» ГНЦ РФ по реализации «Стратегических направлений развития материалов и технологий их переработки на период до 2030 года» // *Авиационные материалы и технологии*. 2015. №1 (34). С. 3–33. DOI: 10.18577/2071-9140-2015-0-1-3-33.
2. Falkiewicz-Dulik M., Janda K., Wypych G. *Handbook of Material Biodegradation, Biodeterioration, and Biostabilization*. 2nd ed. Toronto: ChemTec Publishing, 2015. 465 p.
3. ГОСТ 9.803–88. Единая система защиты от коррозии и старения. Фунгициды. Метод определения эффективности. М.: Изд-во стандартов, 1988. 30 с.
4. Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений: справочник в 2 т. / под ред. А.А. Герасименко. М.: Машиностроение, 1987. Т.1. 688 с.
5. Кузнецов Ю.И., Казанский Л.П. Физико-химические аспекты защиты металлов ингибиторами коррозии класса азолов // *Успехи химии*. 2008. Т. 77. №3. С. 227–241.
6. Каблов Е.Н. Коррозия или жизнь // *Наука и жизнь*. 2012. №11. С. 16–21.
7. Павловская Т.Г., Дешева Е.А., Зайцев С.Н., Козлов И.А., Волков И.А., Захаров К.Е. Коррозионная стойкость алюминиевых сплавов в условиях имитирующих факторы космического полета // *Труды ВИАМ: электрон. науч.-технич. журн*. 2016. №3. Ст. 11. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 08.08.2016). DOI: 10.18577/2307-6046-2016-0-3-11-11.
8. Пехташева Е.Л. Биоповреждения непродовольственных товаров: учеб. для бакалавров. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Дашков и К°, 2013. 332 с.
9. Каблов Е.Н., Полякова А.В., Васильева А.А., Горюшник Ю.С., Кириллов В.Н. Микробиологические испытания авиационных материалов // *Авиационная промышленность*. 2011. №1. С. 35–40.
10. Каблов Е.Н. Материалы и химические технологии для авиационной техники // *Вестник Российской академии наук*. 2012. Т. 82. №6. С. 520–530.
11. Полякова А.В., Кривушина А.А., Горюшник Ю.С., Яковенко Т.В. Испытания на микробиологическую стойкость в условиях теплого и влажного климата // *Труды ВИАМ: электрон. науч.-технич. журн*. 2013. №7. Ст. 06. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 08.08.2016).
12. *Handbook of Environmental Degradation of Materials* / ed. by M. Kutz. New York: William Andrew Publishing, 2005. 602 p.
13. Morton LHG Gaylarde CC The Role of Microbial slimes in biodeterioration // *Culture*. [s.l.]: Oxoid, September, 2001. Vol. 22. P. 1–4.
14. Videla H.A., Herrera L.K. Microbiologically influenced corrosion. Looking to the Future // *Int. Microbiology*. 2005. Vol. 8. P. 169–180.
15. Смирнов Д.Н., Зайцева Е.И., Елисеев О.А. Маслобензостойкий герметик со специальными свойствами на основе полисульфидного олигомера // *Труды ВИАМ: электрон. науч.-технич. журн*. 2014. №11. Ст. 07. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 08.08.2016). DOI: 10.18577/2307-6046-2014-0-11-7-7.
16. Авдеев Я.Г., Фролова Л.В., Кузнецов Ю.И., Зель О.О. Влияние производных триазола на коррозию и наводороживание высокопрочной стали в растворах минеральных кислот // *Коррозия: материалы, защита*. 2008. №11. С. 23–26.
17. Кузнецов Ю.И., Агафонкина М.О., Шихалиев Х.С., Андреева Н.П., Потапов А.Ю. Адсорбция и пассивация

- вация меди триазолами в нейтральных водных растворах // Коррозия: материалы, защита. 2014. №7. С. 33–39.
18. Кузнецов Ю.И., Фролова Л.В. Ингибирование сероводородной коррозии сталей триазолами // Коррозия: материалы, защита. 2014. №5. С. 29–37.
 19. Селянинов И.А., Казанский Л.П. Формирование наноразмерных слоев динитробензимидазола на меди в щелочных фосфатных растворах // Коррозия: материалы, защита. 2008. №7. С. 19–24.
 20. Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents. How to Detect Resistance / G.S. Hall. Springer Science+Business Media, LLC. 2012. 183 p.
 21. ASTM D4445-10. Standard Test Method for Fungicides for Controlling Sapstain and Mold on Unseasoned Lumber (Laboratory Method).
 22. ASTM E1259-10. Standard Practice for Evaluation of Antimicrobials in Liquid Fuels Boiling Below 390°C.
 23. ASTM E1428-99 (2009). Standard Test Method for Evaluating the Performance of Antimicrobials in or on Polymeric Solids Against Staining by *Streptovorticillium reticulum*.
 24. ASTM E1839-07. Standard Test Method for Efficacy of Slimicides for the Paper Industry—Bacterial and Fungal Slime.
 25. ASTM E1891-10a. Standard Guide for Determination of a Survival Curve for Antimicrobial Agents Against Selected Microorganisms and Calculation of a D-Value and Concentration Coefficient.
 26. ASTM E2149-10. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions.
 27. ASTM E2783-11. Standard Test Method for Assessment of Antimicrobial Activity for Water Miscible Compounds Using a Time-Kill Procedure.
 28. ASTM E645-07. Standard Test Method for Efficacy of Microbicides Used in Cooling Water Systems.
 29. ASTM E723-07. Standard Test Method for Efficacy of Antimicrobials as Preservatives for Aqueous-Based Products Used in the Paper Industry (Bacterial Spoilage).
 30. ASTM E875-10. Standard Test Method for Efficacy of Fungal Control Agents as Preservatives for Aqueous-Based Products Used in the Paper Industry.
 31. ASTM E979-09. Standard Test Method for Evaluation of Antimicrobial Agents as Preservatives for Invert Emulsion and Other Water Containing Hydraulic Fluids.
 32. ГОСТ 9.023–74. Единая система защиты от коррозии и старения. Топлива нефтяные. Метод лабораторных испытаний биостойкости топлив, защищенных противомикробными присадками. М.: Изд-во стандартов, 1975. 9 с.
 33. ГОСТ 9.052–88. Единая система защиты от коррозии и старения. Масла и смазки. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М.: Стандартинформ, 2006. 10 с.
 34. ГОСТ 9.048–89. Единая система защиты от коррозии и старения. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М.: Изд-во стандартов, 1989. 22 с.
 35. 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. М.: Изд-во стандартов, 1995. 14 с.
 36. ГОСТ 9.050–75. Единая система защиты от коррозии и старения. Покрытия лакокрасочные. Методы лабораторных испытаний на устойчивость к воздействию плесневых грибов. М.: Изд-во стандартов, 2003. 7 с.
 37. ГОСТ 9.802–84. Единая система защиты от коррозии и старения. Ткани и изделия из натуральных, искусственных, синтетических волокон и их смесей. Метод испытания на грибостойкость. М.: Изд-во стандартов, 1984. 8 с.
 38. Полякова А.В., Кривушина А.А., Горяшник Ю.С., Бухарев Г.М. Испытания на микробиологическую стойкость в натуральных условиях различных климатических зон // Труды ВИАМ: электрон. науч.-технич. журн. 2016. №4. Ст. 11. URL: <http://www.viam-works.ru> (дата обращения: 08.08.2016). DOI: 10.18577/2307-6046-2016-0-4-11-11.
 39. NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS document M38-A. NCCLS, USA, 2002.
 40. Hamada S., Fujita S. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry // Histochemistry. 1983. Vol. 79. P. 219–226.
 41. Alef K., Nannipieri P. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. 1995.