

МЕТОД АНАЛИЗА ЧИСЛЕННОСТИ И АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПОВЕРХНОСТИ МАТЕРИАЛОВ

The article is devoted to analyses of content and activity of microorganisms on surfaces of materials. In the result of fulfilled research, it was proposed bio-calorimetric method of microorganism's determination on silicates in the line range of four orders with sensitivity 10^4 cu/sm², precision $\pm 10\%$. It takes 1–2 hours for estimation of bacteria number and their physiological activity in liquid media and on the surfaces of materials. Method may be used for estimation of antimicrobial substances efficiency in defense of materials against biodestruction.

Введение. Содержание микроорганизмов и их активность на поверхности различных материалов представляют большой практический интерес для биотехнологии, биоэкологии, промышленного производства, так как более 90% всех микроорганизмов в природе и технологических процессах функционирует в иммобилизованном состоянии.

Силикатные материалы широко используются в строительстве в качестве конструктивных материалов для возведения зданий и сооружений, и их биоповреждение значительно сокращает срок эксплуатации строительных конструкций и увеличивает затраты на ремонтные работы. Все это наносит большой экономический ущерб.

Одной из актуальных биотехнологических задач является защита материалов и объектов от биоповреждений бактериями и грибами с помощью антимикробных препаратов. Данные вещества широко используются в защитных покрытиях, процессах мойки, дезинфекции и стерилизации поверхности изделий, конструкций и оборудования.

Обязательным условием применения химического способа борьбы с микроорганизмами является контроль активности и эффективности средств защиты от биоповреждений. Он проводится по степени загрязненности поверхностей микроорганизмами до и после обработки.

Существует большое количество классических и инструментальных методов оценки содержания и активности микроорганизмов [1], однако почти все из них предназначены для анализа клеток в жидких средах, и только немногие методы позволяют характеризовать численность и состояние микроорганизмов на поверхности материалов. В этих условиях одним из традиционно используемых подходов для оценки микробной загрязненности объектов является взятие смывов микроорганизмов с поверхностей с последующим их анализом прямыми и косвенными методами.

Прямые способы анализа дают абсолютное значение содержания микроорганизмов. Они, как правило, не характеризуют активность клеток. Среди прямых методов анализа в лабораторной практике широко применяются способы посева и культивирования микроорганизмов на поверх-

ности агаризованных питательных сред. Данные методы просты, высокочувствительны, не требуют измерительного оборудования, поэтому используются на производстве и в арбитражных случаях. Основные недостатки способов культивирования связаны с высокой длительностью, трудоемкостью, большим расходом питательных сред и экономической неэффективностью при большом количестве микробиологических испытаний. Поэтому наблюдается тенденция их замены на инструментальные методы.

Косвенные методы микробиологического анализа характеризуют содержание и активность микроорганизмов. Они быстры, точны, имеют низкие трудозатраты и экономически эффективны при увеличении количества измерений. Эти способы нуждаются в инструментальных средствах измерений и дают относительное значение показателей, что требует проведения процедуры калибровки средств измерений с помощью прямых методов микробиологического анализа.

Для гарантированного обеспечения микробиологического качества и безопасности продукции, а также защиты материалов от биоповреждений, требуется проведение большого объема микробиологических испытаний. В этой связи важное значение имеет разработка простых, быстрых и эффективных инструментальных способов микробиологического анализа содержания и активности микроорганизмов на поверхности различных материалов и изделий.

Основная часть. Цель работы – разработка экспресс-метода микробиологического анализа поверхности силикатных материалов.

В работе использовали чистые культуры клеток микроорганизмов *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ, а также бактерии нитрификаторы 2-го рода, выделенные из разрушенных бетонов, как описано в [2]. Суточные культуры исследуемых бактерий разводили свежим питательным бульоном (ПБ) в 5 раз, выращивали при 30°C с аэрацией в течение 2 ч и высевали десятикратные разведения на поверхность питательного агара (ПА). Засеянные культуры термостатировали при оптимальных температурах развития микроорганизмов на протяжении 3 сут. Подсчет численности микроорга-

низмов проводили по числу выросших колоний клеток с учетом разведений [3].

Анализируемыми объектами служили образцы силикатных материалов, приготовленные в лабораторных условиях. Для получения образцов использовали песок и цементную смесь при соотношении 3 : 1 (цемент М 400, соотношение вода : цемент = 0,7), а также сухую смесь кладочного раствора для кирпичей и бетонных блоков производства ОАО «Красносельскстрой». К 4 г навески сухой смеси добавляли 1 см³ водной среды, перемешивали до однородной консистенции, помещали в разборную ячейку микрокалориметра, выдерживали смесь до ее застывания и при необходимости стерилизовали в автоклаве при 120°С в течение 15 мин.

На поверхность приготовленных образцов наносили 0,2 см³ чистой культуры микроорганизмов в ПБ в диапазоне концентраций 10⁴–10⁹ кл./см³ или физиологический раствор (ФР).

Содержание микроорганизмов на стерильных образцах после нанесения и культивирования клеток определяли методом смыва микроорганизмов с поверхности увлажненным стерильным ватным тампоном. Тампон помещали в ФР или ПБ, готовили десятикратные разведения и высевали последние из них на поверхность ПА. После культивирования клеток в термостате подсчитывали число выросших колоний и определяли поверхностную концентрацию микроорганизмов по формуле

$$C = \frac{aV}{Sv} 10^f,$$

где a – среднее количество выросших колоний клеток; V – объем ФР, в который помещался тампон после смыва; S – площадь взятия смыва; v – объем среды, посеянный на поверхность ПА; f – степень разведения смыва.

Параллельно с высевом микроорганизмов на ПА регистрировали мощность тепловыделения клеток в ПБ на микрокалориметре МКМ-Ц в соответствии с [4].

При посеве голодных бактерий *Ps. fluorescens* из ФР на поверхность силикатного материала не было выявлено признаков жизнедеятельности микроорганизмов по их тепловыделению. После высева этих же бактерий из ПБ при концентрации выше 10⁴ кл./см² было зарегистрировано тепловыделение образцов.

Для построения калибровочных зависимостей определяли стационарные значения мощности тепловыделения клеток ($q_{\text{стан}}$) в разведениях смывов или чистых культур в ПБ.

Измерение тепловыделения иммобилизованных микроорганизмов проводили на образцах, помещенных в разборные ячейки микрокалориметра МКМ-Ц и засеянных чистыми культурами бактерий *B. subtilis* или *Ps. fluorescence* в ПБ в концентрациях 10⁴–10⁸ кл./см². После

загрузки проб в микрокалориметр регистрировали мощность тепловыделения поверхностной микрофлоры в течение 2–3 ч.

Строили графики зависимости мощности тепловыделения иммобилизованных микроорганизмов от содержания жизнеспособных бактерий, найденных методом посева клеток на ПА. Полученные калибровочные зависимости использовали для определения концентрации микроорганизмов на поверхности анализируемых материалов.

Термообработку образцов с микроорганизмами (10⁸ кл./см²) проводили при 100°С, выдерживая 1–5 мин, с последующим их охлаждением до комнатной температуры и регистрацией остаточного тепловыделения клеток.

Результаты измерений обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Загрязнение и разрушение твердых материалов клетками микроорганизмов, как правило, начинается с поверхности и далее распространяется вглубь с разной скоростью, в зависимости от свойств материалов, особенностей микроорганизмов, а также условий окружающей среды.

Степень биоповреждений материалов в первую очередь зависит от содержания микроорганизмов-деструкторов и их активности на поверхности материалов.

Процессы жизнедеятельности микроорганизмов сопровождаются выделением тепла. Мерой физиологической активности клеток с энергетической точки зрения может являться скорость их тепловыделения, которая отражает как интенсивность протекающих метаболических процессов, так и скорость размножения микроорганизмов.

На рис. 1 приведена логарифмическая термограмма роста бактерий *Ps. fluorescens* на поверхности застывшего кладочного раствора в кюветах микрокалориметра. Как видно из рис. 1, наблюдается быстрая (I) и медленная (II) фазы тепловыделения образцов. Быстрая фаза отражает переходные процессы в микрокалориметре и адаптацию клеток к материалу. Медленная фаза характеризует ростовые процессы клеток на поверхности материала.

О содержании и состоянии микроорганизмов на поверхности материалов в биокалориметрическом методе можно судить по изменению удельной скорости тепловыделения образцов после завершения переходного процесса (рис. 1, область II).

Тепловыделение микроорганизмов связано с активностью и численностью клеток следующей зависимостью:

$$q_t = kFN_t,$$

где k – экспериментальный коэффициент; F – физиологическая активность клеток; N_t – содержание микроорганизмов.

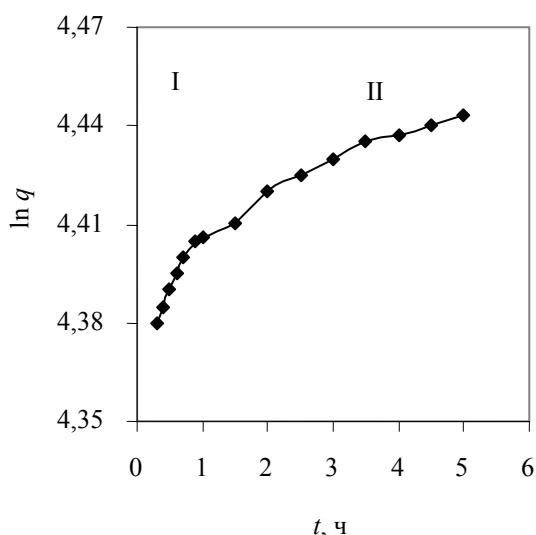


Рис. 1. Термограммы развития бактерий *Pseudomonas fluorescens* (10^7 кл./см²) на поверхности застывшего кладочного раствора при 30°C

Для использования данной формулы при оценке численности клеток в водной среде или на поверхности материала необходимо проводить калибровку микрокалориметра и определять физиологическую активность клеток.

На рис. 2 приведен вид полученной калибровочной зависимости в логарифмической системе координат.

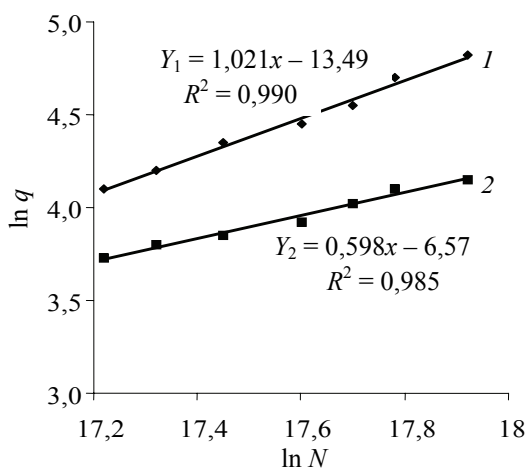


Рис. 2. Калибровочная зависимость величины тепловыделения от содержания клеток *Bacillus subtilis*: 1 – клетки в ПБ; 2 – клетки на поверхности бетона

На оси абсцисс представлены значения численности клеток по данным метода посева на чашках, а по оси ординат – стационарные значения мощности тепловыделения клеток в ПБ или на поверхности силикатного материала.

Зависимости хорошо описываются линейными уравнениями, тангенс угла наклона кото-

рых характеризует физиологическую активность клеток в свободном или иммобилизованном состояниях.

Как видно из рис. 2, физиологическая активность клеток *B. subtilis* на поверхности материала снижалась в 1,5 раза по сравнению с жидкой средой.

Для оценки скорости размножения бактерий была изучена кинетика изменения тепловыделения клеток в свободном и иммобилизованном состояниях.

На рис. 3 приведены графики зависимости относительной мощности тепловыделения бактерий нитрификаторов 2-го рода от времени развития микроорганизмов на поверхности силикатных материалов и в ПБ.

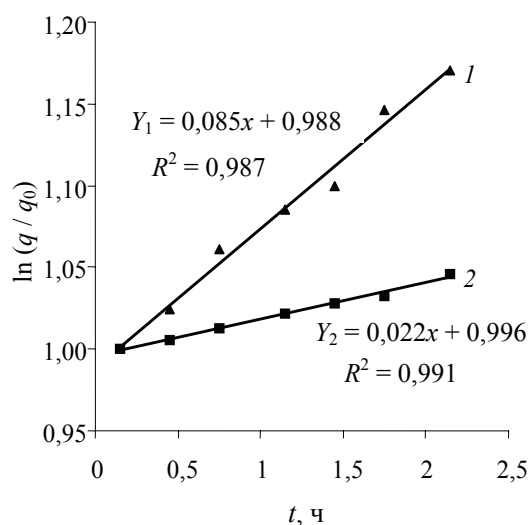


Рис. 3. Характеристика ростовой активности бактерий нитрификаторов 2-го рода: 1 – в ПБ; 2 – на поверхности силикатного материала

Зависимости хорошо спрямляются в полуллогарифмических координатах и описываются выражением

$$\ln \left(\frac{q_t}{q_0} \right) = mt,$$

где q_t , q_0 – регистрируемая мощность тепловыделения микроорганизмов соответственно в текущий и начальный момент времени; m – удельная скорость роста тепловыделения клеток; t – время наблюдения.

Как видно из рис. 3, ростовая активность бактерий нитрификаторов 2-го рода в иммобилизованном состоянии снижается в 4 раза по сравнению с жидкой средой.

Полученные результаты указывают, что биокалориметрический метод анализа позволяет в течение 1–2 ч определять ростовую активность клеток как в водной среде, так и на поверхности материалов в диапазоне значений $m = 0,01–2,0$ ч⁻¹.

Для характеристики устойчивости микроорганизмов в иммобилизованном состоянии и в ПБ использовали способ термообработки образцов при 100°C и регистрации остаточного тепловыделения клеток.

Кинетические зависимости термоинактивации микроорганизмов в водной среде и на поверхности силикатного материала приведены на рис. 4.

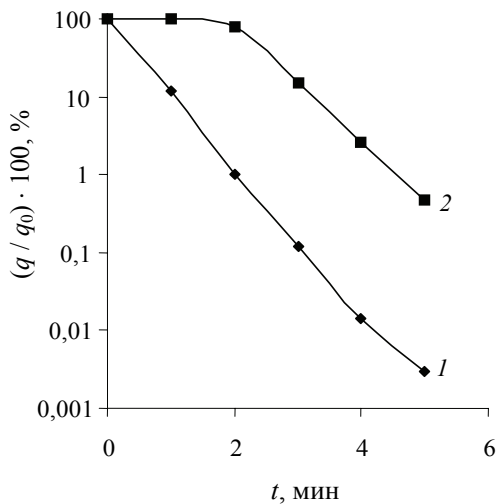


Рис. 4. Относительное изменение тепловыделения бактерий *Escherichia coli*:
1 – в ПБ; 2 – на поверхности силикатного материала после тепловой обработки при 100°C

Интенсивность тепловыделения микроорганизмов в ПБ (рис. 4, прямая 1) линейно зависит от концентрации жизнеспособных клеток в интервале четырех порядков и может быть описана уравнением

$$q_t = q_0 \cdot \exp(-k_r t),$$

где q_0 , q_t – начальное и текущее тепловыделение бактерий соответственно; k_r – удельная константа скорости гибели клеток.

При сравнении кинетики термоинактивации микроорганизмов в ПБ и на поверхности материала видно, что резистентность иммобилизованных клеток бактерий в 2 раза выше, чем в жидкой среде. Изменяется также вид кинетической зависимости, и уменьшение тепловыделе-

ния клеток на поверхности материала описывается пороговой зависимостью (рис. 4, кривая 2).

Линейный характер термоинактивации микроорганизмов в ПБ указывает на однородность популяции клеток. Пороговая зависимость гибели клеток при термообработке на поверхности материалов может быть связана с инерционностью разогрева образцов и гетерогенностью популяции клеток, отличающихся параметрами их термоинактивации.

Заключение. В работе предложен биокалориметрический метод оценки содержания и физиологической активности микроорганизмов на поверхности силикатных материалов с чувствительностью 10^4 кл./см², линейным диапазоном 4 порядка, относительной погрешностью $\pm 10\%$. Способ позволяет в течение 1–2 ч определить численность бактерий и их физиологическую активность как в водной среде, так и на поверхности материалов по удельной скорости тепловыделения микроорганизмов.

Изучение кинетики гибели микроорганизмов при тепловой стерилизации показало, что устойчивость клеток *E. coli* к термообработке в иммобилизованном состоянии на поверхности силикатных материалов в 2 раза выше по сравнению с микроорганизмами в свободном состоянии.

Литература

1. Луста, К. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / К. А. Луста, Б. А. Фихте. – Пущино: ОНТИ НЦБИ, 1990. – 186 с.
2. Игнатенко, А. В. Биоповреждение материалов и выделение микроорганизмов-деструкторов / А. В. Игнатенко, И. Н. Рой // Ресурсо- и энергосберегающие технологии и оборудование, экологически безопасные технологии: материалы Междунар. науч.-техн. конф., Минск, 19–20 нояб. 2008 г.: в 2 ч. / Белорус. гос. технол. ун-т. – Минск, 2008. – Ч. 2. – С. 362–365.
3. Беясова, Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум / Н. А. Беясова. – Минск: БГТУ, 2007. – 160 с.
4. Игнатенко, А. В. Микробиологические, органолептические, визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия: лаб. практикум / А. В. Игнатенко, Н. В. Гриц. – Минск: БГТУ, 2003. – 114 с.