



## Санитарный контроль воды

Для нормальной работы технологических схем с замкнутым оборотом воды необходимо обеспечить достаточную степень ее очистки, а также предотвратить развитие микроорганизмов. Присутствие последних, в первую очередь бактерий и мицелиальных грибов, затрудняет эксплуатацию системы [1].

На ЗАО «Атлант» в системе оборотного водоснабжения испытательной станции стиральных машин-автоматов (СМА) было зарегистрировано изменение качества воды, характеризующееся появлением мутности и неприятного запаха. При хранении СМА (до начала их эксплуатации) на поверхности резиновых уплотнителей дверок иногда

морфологических типов. Концентрацию жизнеспособных клеток в среде определяли как число колониеобразующих единиц в 1 мл воды (КОЕ/мл) с учетом разведений пробы.

Для получения чистых культур микроорганизмов отбирали по 2 колонии каждого преобладающего морфологического типа и рассеивали их на соответствующей плотной среде до изолированных колоний методом истощающего штриха. После трехкратной «расчистки» отобранных культур проводили микроскопическое исследование для подтверждения их однородности.

Идентифицировали бактерии и грибы с учетом морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков согласно общепринятым методикам [2], с использованием определителей бактерий [3] и мицелиальных грибов [4].

Для изучения чувствительности выделенных из оборотной воды микроорганизмов к биоцидным препаратам применяли суспензионный метод (для бактерий) и метод агаровых блоков (для грибов) [5]. Суть первого заключалась в следующем: к суспензии разведенных в жидкой питательной среде до  $10^4$  КОЕ/мл клеток бактерий добавляли растворы образцов антимикробных препаратов в определенных пропорциях, получая их действующие концентрации в диапазоне 0,050— 0,005%. Инкубировали посеvy сутки при 30°C, после чего учитывали степень мутности суспензий и производили высевы на плотные питательные среды подходящего состава. После формирования изолированных колоний подсчитывали их количество и определяли концентрацию жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) с учетом фактора разведения суспензий.

Минимальную ингибирующую концентрацию биоцида (МИК) по отношению к той или иной бактериальной тест-культуре определяли как наименьшую (из испытанных) концентрацию антимикробного агента, при которой тормозится рост бактерий (суспензия после инкубирования остается прозрачной). Биоцидные свойства препаратов (способность

Таблица 1. Общее содержание бактерий и мицелиальных грибов в образцах оборотной воды

Проба оборотной воды	Содержание микроорганизмов в образце, КОЕ/мл:	
	бактерии	грибы
Проба из системы оборотного водоснабжения из бака очищенной воды (в первый день после полной замены оборотной воды)	$2,9 \cdot 10^2$	$<1 \cdot 10^1$
Проба из системы оборотного водоснабжения из бака очищенной воды (в пятый день после полной замены оборотной воды)	$3,8 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^1$
Проба из СМА — патрубок слива	$2,4 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^1$
Проба из СМА — патрубок слива	$8,2 \cdot 10^2$	$<1 \cdot 10^1$
Проба из СМА — патрубок слива	$4,7 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^1$
Проба из СМА — патрубок слива	$5,0 \cdot 10^2$	$4,2 \cdot 10^1$
Проба из СМА — уплотнитель дверки	$1,4 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^1$
Проба из СМА — уплотнитель дверки	$2,3 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^1$

наблюдались плесневые обрастания, которые исчезали после 1—3 стирок. Возникла задача определения способов борьбы с микробной контаминацией воды. Объектами исследования служили пробы воды, отобранные в разное время на испытательной станции из бака в системе оборотного водоснабжения, из манжет и патрубков слива в стиральных машинах с различными сроками хранения, а также экспериментально синтезированные в Институте химии новых материалов НАН Беларуси биоцидные препараты на основе полигексаметилен-гуанидина (ПГМГ).

Для изучения микробиологического состава системы оборотного водоснабжения пробы воды серийно разводили в физиологическом растворе и высевали методом Коха на поверхность агаризованных питательных сред различного состава. Инкубировали посеvy при 30 °C в течение 48—72 часов, после чего производили подсчет количества колоний преобладающих

обусловливать гибель клеток) оценивали с помощью параметра «выживаемость» (6) по формуле:

$$B = \frac{K_1}{K_0} 100(\%)$$

где  $K_1$  — концентрация жизнеспособных клеток, обработанных биоцидом в суспензионном методе;

$K_0$  — исходная концентрация клеток в инокуляте.

Заключительной операцией технологического процесса изготовления СМА являются приемо-сдаточные испытания, которым подвергается каждая выпущенная машина. Они проводятся согласно методике, разработанной на ЗАО «Атлант». В ходе тестирования проверяется функционирование, водонепроницаемость уплотнений, целостность узлов и деталей СМА с заполнением бака водой. В этом процессе с поверхности деталей, контактирующих с водой, происходит смыв остатков консервационных и технологических смазок и других загрязнений. Периодически в системе обратного водоснабжения осуществляется полная замена воды.

Исследование морфологических и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов, выделенных из образцов воды, позволило отнести большинство из них к числу бактерий и мицелиальных грибов. В табл. 1 приведены результаты определения содержания клеток бактерий и колониеобразующих единиц (фрагментов мицелия и спор) грибов в исследованных пробах.

Как видно из табл. 1, концентрация жизнеспособных бактерий почти во всех образцах превышает критическую, приближаясь к  $10^6$  КОЕ/мл, причем преобладающими микроорганизмами, контаминирующими оборотную воду, являются бактерии. Обращает

на себя внимание скорость роста числа микроорганизмов: в первый день после полной замены воды в системе обратного водоснабжения (после очистки воды с помощью бензомаслоот-делителя и фильтрационно-сорбционного модуля) в пробах из бака содержалось  $2,9 \cdot 10^2$  КОЕ/мл бактерий, а уже через 4 дня —  $3,8 \cdot 10^5$  КОЕ/мл. Такое быстрое увеличение можно объяснить следующими причинами:

- вода проходит через узлы и детали СМА, где происходит самое различных веществ, их накопление, в том числе ПАВ, которые могут использоваться некоторыми бактериями в качестве источников углерода и энергии;

- интенсивность водных потоков обеспечивает обогащение воды кислородом воздуха, что способствует развитию аэробных бактерий;

- повышение температуры в летние месяцы благоприятствует росту большинства почвенных и водных бактерий.

Колонии преобладающих морфологических типов использовали для получения чистых культур, которые идентифицировали до рода. В табл. 2 приведена характеристика бактерий и грибов, доминирующих в составе оборотной воды и остатков воды из СМА после приемо-сдаточных испытаний.

Как следует из данных таблицы, большинство видов бактерий, доминирующих в составе оборотной воды и остатках воды из СМА, являются аэробами, и, таким образом, их развитие в оборотной воде должно стимулироваться постоянным обогащением жидкости кислородом воздуха, которое имеет место а интенсивных потоках, создаваемых в системе обратного водоснабжения и при испытаниях стиральных машин.

Таблица 2. Отличительные особенности микроорганизмов, доминирующих в составе образцов воды

Морфология клеток (×900 для бактерий и ×100 для грибов)	Штамм	Отличительные особенности представителей рода
	<i>Alcaligenes</i> sp. РБ-А	Грамотрицательные короткие одиночные палочки, перитрихи, облигатные азоты, широко распространены в почве и воде, способны окислять молекулярный водород и расти как хемолитотрофы.
	<i>Arthrobacter</i> sp. РМ-3	Грамположительные палочки, распадающиеся в стареющих культурах на кокки, располагаются одиночно и парами, азоты, широко распространены в окружающей среде, преимущественно в почве.
	<i>Mycobacterium</i> sp. ЖА-7	Прямые или слегка изогнутые грамположительные палочки, неподвижные, неспорообразующие, азоты и хемоорганотрофы, образуют желтые колонии, широко распространены в почве и воде. Способны разлагать ПАВ.
	<i>Paracoccus</i> sp. РМ-1	Грамотрицательные неподвижные кокки или короткие палочки, азоты, но могут расти в анаэробных условиях в присутствии нитрата, окислять молекулярный водород (хемолитотрофный метаболизм). Способны разлагать ПАВ.
	<i>Pseudomonas</i> sp. РМ-2	Прямые или слегка изогнутые грамотрицательные палочки, подвижные, лопотрихи, азоты, в присутствии нитрата способны к анаэробному росту, некоторые могут окислять молекулярный водород (хемолитотрофный метаболизм), разлагать широкий круг токсичных и трудно деградируемых субстратов, повсеместно распространены в окружающей среде, в основном в воде.
	<i>Rhodococcus</i> sp. РБЖ-1	Грамположительные бактерии, способные к образованию различных форм (от палочек до мицелия), колонии окрашены в кремово-желтоватый цвет, образуют большое количество слизи, азоты, широко распространены, способны разлагать ПАВ и другие ксенобиотики.
	<i>Penicillium</i> sp. РР-17	Высшие несовершенные мицелиальные грибы, чрезвычайно широко распространенные в окружающей среде (вездесущие), разлагающие широкий круг органических субстратов. Размножаются бесполым путем с помощью конидий в виде «кисточек».
	<i>Aspergillus</i> sp. АН-12	Высшие несовершенные мицелиальные грибы, чрезвычайно широко распространенные в окружающей среде (вездесущие), разлагающие широкий круг органических субстратов. Бесполое размножение — конидиями с радиальным расположением на конидиеносцах.

Еще одна особенность выделенных из проб бактерий — их способность формировать слизистые слои на поверхности клеточной стенки. Об этом свидетельствует внешний вид их колоний на поверхности питательного агара (рис. 1); многие колонии выглядят блестящими благодаря слизистым слоям в их составе. Клетки некоторых бактерий на микрофотографиях объединены в скопления за счет слизистых масс, что особенно хорошо заметно по отношению к *Rhodococcus* sp. РБЖ-1 (табл. 2).

В Институте химии новых материалов НАН Беларуси разработан ряд композиций биоцидных препаратов с широким спектром

действия, включающих полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ ГХ), полигексаметиленгуанидин фосфат (ПГМГ Ф) и четвертичное аммониевое соединение (ЧАС) в разных пропорциях. Эти соединения малотоксичны по отношению к теплокровным животным и человеку, не вызывают аллергии, не летучи, хорошо растворимы в воде, не имеют цвета и запаха, устойчивы при хранении, не приводят к коррозии оборудования и обладают высокой биоцидной и биостатической активностью по отношению к различного рода микроорганизмам: грибам, бактериям, водорослям, вирусам и др. [6]. Благодаря этим свойствам соединения данного ряда можно использовать для ограничения развития микроорганизмов в системе оборотного водоснабжения на испытательной станции СМА ЗАО «Атлант», что подтверждено проведенными микробиологическими исследованиями.

В табл. 3 приведены минимальные ингибирующие концентрации исследованных препаратов биоцидов по отношению к доминирующим в оборотной воде бактериальным штаммам.

Анализ представленных данных позволяет заключить, что среди шести бактериальных штаммов, которые отобраны в качестве доминирующих в составе контаминированной оборотной воды, наиболее устойчивыми к действию всех испытанных антибактериальных веществ являются *Alcaligenes* sp. РБ-А и *Paracoccus* sp. РМ-1. Эти бактерии сохраняют способность развиваться в присутствии наиболее высоких концентраций антимикробных веществ; среди 6 испытанных препаратов биоцидов наиболее выраженной антибактериальной активностью обладают образцы ПГМГ ГХ : ЧАС (1:1) и ПГМГ Ф : ЧАС (1:1). Эти препараты оказывают ингибирующее действие на развитие бактерий при содержании в среде в самых низких концентрациях (не более 0,01%). В табл. 4 приведены параметры, характеризующие антибактериальные свойства самых активных веществ по отношению к наиболее устойчивым бактериям. Как следует из представленных здесь данных, наиболее активные образцы антимикробных препаратов проявляют по отношению к самым устойчивым бактериям выраженные биоцидные свойства. При этом выживаемость бактерий обоих

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации препаратов по отношению к бактериям

Биоцид	МИК (%) препарата по отношению к клеткам штаммов					
	РБ-А	РМ-1	РМ-2	РМ-3	РБЖ-1	ЖА-7
ПГМГ ГХ : ЧАС (1:1)	0,010	0,005	0,005	<0,005	<0,005	<0,005
ПГМГ ГХ : ЧАС (2:1)	0,010	0,010	0,010	<0,005	<0,005	<0,005
ПГМГ ГХ : ЧАС (10:1)	0,050	0,030	0,020	<0,005	<0,005	<0,005
ПГМГ Ф : ЧАС (1:1)	0,010	0,010	0,005	<0,005	<0,005	<0,005
ПГМГ Ф : ЧАС (2:1)	0,050	0,050	0,020	<0,005	<0,005	<0,005
ПГМГ Ф : ЧАС (10:1)	0,050	0,050	0,020	<0,005	<0,005	<0,005

Таблица 4. Антибактериальные свойства препаратов при концентрации 0,01%

Тест-культура	Биоцид	Содержание жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		В, %
		исходное	через 24 ч инкубирования с биоцидом	
<i>Alcaligenes</i> sp. РБ-А	ПГМГ ГХ : ЧАС (1:1)	4,3·10 <sup>4</sup>	1,1·10 <sup>2</sup>	0,26
	ПГМГ ГХ : ЧАС (2:1)		4,9·10 <sup>2</sup>	1,14
	ПГМГ Ф : ЧАС (1:1)		2,5·10 <sup>2</sup>	0,58
<i>Paracoccus</i> sp. РМ-1	ПГМГ ГХ : ЧАС (1:1)	3,1·10 <sup>4</sup>	<1·10 <sup>1</sup>	0,03
	ПГМГ ГХ : ЧАС (2:1)		3,4·10 <sup>2</sup>	1,10
	ПГМГ Ф : ЧАС (1:1)		2,3·10 <sup>2</sup>	0,74



Рис. 1. Морфология бактериальных колоний на поверхности питательного агара

штаммов в присутствии препаратов ПГМГ ГХ : ЧАС (1:1) и ПГМГ Ф : ЧАС (1:1) не достигает даже 1%.

Таким образом, можно рекомендовать использование препаратов ПГМГ ГХ : ЧАС (1:1) и ПГМГФ: ЧАС (1:1) в концентрации 0,01% для борьбы с бактериями, контаминирующими оборотную воду на станции испытания стиральных машин ЗАО «Атлант».

Микромицеты, выделенные из образцов оборотной воды, исследованы в методе агаровых блоков по степени чувствительности к наиболее активным биоцидным препаратам. На рис. 2 приведены фрагменты чашек Петри с суслоагаром, на которых вокруг агаровых блоков в течение 2 недель развивались микромицеты. Чем хуже были условия для этого, тем меньшая по ширине зона обрастания блока формировалась. Иными словами, ширина зоны разрастания мицелия обратно пропорциональна ингибирующей активности препаратов. В каждой чашке в составе питательной среды содержалось по 0,1% антимикробного вещества.

Можно видеть, что все испытанные препараты препятствовали развитию мицелиальных грибов (проявляли фунгистатическую активность), если сопоставлять результаты с контрольным посевом, где в составе среды отсутствовало биоцидное вещество. В то же время ни один из препаратов не вызывал гибель микромицетов, то есть не характеризовался фунгицидной активностью при испытании стандартным методом на питательной среде. Однако в оборотной воде условия для развития микромицетов иные; гораздо меньшее количество питательных веществ, более низкая концентрация мицелия и спор (табл. 1) и присутствуют факторы конкуренции, продуцируемые бактериями.

Для подтверждения возможности применения на станциях испытания стиральных машин ЗАО «Атлант» препаратов ПГМГ ГХ: ЧАС (1:1) и ПГМГ Ф: ЧАС (1:1) определяли их действие на микроорганизмы в составе оборотной воды. Отобранные из бака оборотной воды в начале испытаний пробы по 20 мл вносили в шапочные колбы, добавляли в каждую раствор одного из препаратов, получая действующие концентрации веществ 0,01%. Контрольной служила проба оборотной воды без биоцида (20 мл). Образцы инкубировали

при 30°C с аэрацией в течение 7 суток, после чего производили высевы на плотные питательные среды для учета числа сохранивших жизнеспособность клеток бактерий и грибов. 8 табл. 5 приведены полученные результаты.

Исследования микробиологического состава воды в системе оборотного водоснабжения на испытательной станции СМА ЗАО «Атлант» позволили выделить в виде чистых культур несколько штаммов бактерий и мицелиальных грибов, по отношению к которым испытана антимикробная активность серии новых разработанных в Беларуси биоцидных композиций. Показано, что две наиболее высокоэффективные из них в концентрации 0,01% снижают до минимума (<101 КОЕ/мл) численность всех микроорганизмов в оборотной воде и могут обеспечить эффективный способ борьбы с микробной контаминацией.

Лариса АНТОНОВСКАЯ, аспирант кафедры биотехнологии и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета

Наталья БЕЛЯСОВА, доцент кафедры биотехнологии и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета, кандидат биологических наук

Вячеслав ОЛЬХОВИК, заведующий лабораторией органических красителей и люминофоров Института химии новых материалов ИАН Беларуси, кандидат биологических наук

Владимир ТАРАСЕВИЧ, ведущий научный сотрудник Института химии новых материалов НАН Беларуси, доктор химических наук

Марина СТЫГАРЬ, начальник лаборатории прочностных и ресурсных испытаний ЗАО «Атлант».

**Источник:** Наука и инновации.-2009.-№4.-  
С.19-22.