

ИЗСЛЕДВАНЕ НА МИКРОБНАТА ОБСЕМЕНЕНОСТ НА ПРОБИ ИЗЛОЖЕНИ ЗА 30 МЕСЕЦА В ОТКРИТИЯ КОСМОС

Анна Бузекова-Пенкова¹, Юлиан Караджов¹,
Яна Евстатиева², Дилиана Николова², Валентин Савов²

¹Институт за космически изследвания и технологии – Българска академия на науките

²Катедра Биотехнология, Биологически факултет, СУ “Св. Климент Охридски”

e-mail: a_bouzekova@abv.bg, doctorka@abv.bg

Ключови думи: алуминиеви сплави, нанодиамант, микробна обсемененост

Резюме: В рамките на експеримент “ОБСТАНОВКА”, проби от различни материали са изложени в продължение на 30 месеца от външната страна на МКС. Тук, ние докладваме предварителни данни за микробното замърсяване на тези образци.

INVESTIGATION OF THE MICROBIAL CONTAMINATION OF SAMPLES THAT HAVE BEEN EXPOSED FOR 30 MONTHS IN SPACE

Anna Buzekova-Penkova¹, Julian Karadjov¹,
Yana Evstatieva², Dilyana Nikolova², Valentin Savov²

¹Space Research and Technology Institute – Bulgarian Academy of Sciences

²Biotechnology Department, Biological Faculty, Sofia University “St. Kliment Ochridski”

e-mail: a_bouzekova@abv.bg, doctorka@abv.bg

Keywords: aluminum alloys, nanodiamond, microbial contamination

Abstract: In the frame of the OBSTANOVKA experiment, samples of different materials were exposed for 30 months to open space conditions on the surface of ISS. Here, we report preliminary data on the microbial contamination of these samples.

Микробиологията в орбита около Земята

В последните години се забелязва все по-силен научно-практически интерес към микроорганизмите в и върху Международната космическа станция (МКС). Тази „микробиология на околоземна орбита“ има няколко аспекта.

На първо място това са микроорганизмите във вътрешността на МКС, които биха могли да влияят негативно на здравето на космонавтите или върху свойствата на различни материали, използвани при направата на МКС и апаратурата в нея. Изключително важно е да се минимизират всички фактори, които биха довели до възможната поява на инфекциозна болест в специфичните условия на МКС [1].

Различни автори са изследвали в наземни условия влиянието на симулирана микрогравитация върху вирулентността на различни микроорганизми. Те установяват, че микрогравитацията влияе различно на различните микроорганизми: тя прави едни по-вирулентни, докато при други микроорганизми тя намалява. Това означава, че земните оценки за вирулентността на един или друг микроорганизъм могат съществено да се променят в условията на орбитален полет [2].

Възможността за възникване и разпространяване на инфекция винаги е реално, затова редица автори са изследвали микробната обсемененост на повърхностите, праха и въздуха в МКС [3–5]. Микроорганизмите могат да бъдат опасни не само за хората на МКС. Още на космическата станция „Мир“ възникват сериозни проблеми, причинени от микроорганизми,

които колонизират повърхността на метали и полимери и водят до опасна корозия и деградация на материалите. Опитът на „Мир“ показва, че, особено при дълги орбитални мисии, е необходима система за постоянен микробиологичен мониторинг, който да предупреждава за потенциален проблем [6]. На МКС е изградена такава система [7, 8].

Има ли микроорганизми на външната повърхност на МКС? Намирането на земни морски бактерии там повдига интересни въпроси. Някои автори търсят отговор на въпроса как микроорганизми могат да попаднат там в предложения от тях „йоносферен лифт“ [9]. Предложеното обяснение е само хипотеза, но чрез изследване на ледените късчета, падащи при град, са открити микроорганизми в атмосферата на височина до 40 км [10]. Напълно е възможно микроорганизми да попадат и на много по-голяма височина, включително до орбитата на МКС. Накрая, върху оборудването за космически експерименти, изнасяно на външната повърхност на МКС, ако не са взети специални мерки, присъстват земни микроорганизми. Как им се отразява престоят във вакуум, силните колебания на температурата и космическата радиация, са въпроси търсещи все още отговори.

В рамките на експеримент „ОБСТАНОВКА“ на външната страна на МКС бе монтиран блок ДП-ПМ, съдържащ образци от алуминиева сплав с добавка на Волфрам и нанодиамант, както и други образци, покрити със стъкловъглерод. Тези проби и техният контейнер бяха изложени на космически условия в течение на 30 месеца. Тук ние докладваме предварителни данни за микробното замърсяване на тези проби.

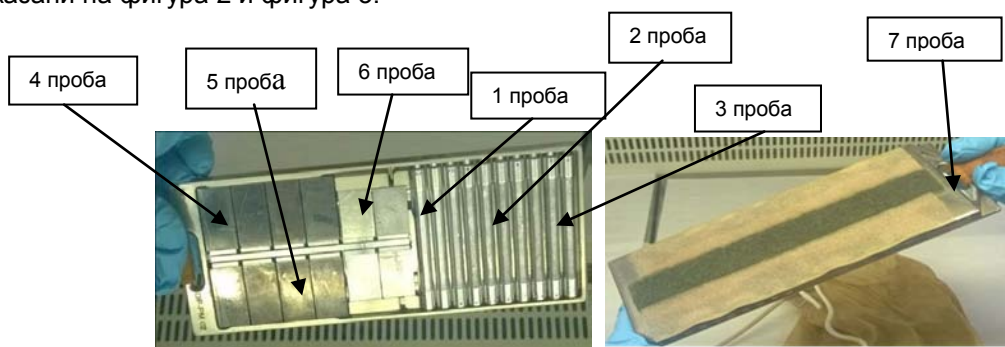
Вземане на проби за микробна обсемененост

Отварянето на херметичния контейнер и изваждането на блока е осъществено в стерилни условия. (фигура 1 а, б и в).



Фиг. 1

Вземане на проби за анализ - 7 броя проби за микробна обсемененост от местата показани на фигура 2 и фигура 3.



Фиг. 2

Фиг. 3

Места, откъдето са взети пробите за микробиологичен анализ:

Проба 1 – от първата ламела на изследваната пластина (от т. нар. цилиндричен образец);

Проба 2 – от петата ламела на изследваната пластина;

Проба 3 - от деветата ламела на изследваната пластина;

Проба 4 - от първия черен плосък образец;

Проба 5 - от седмия черен плосък образец;

Проба 6 - от първия плосък образец от Al сплав;
 Проба 7- от гърба на пластината в близост до велкрото;
 Проба 8 - от ухото на пластината.

Използваните по-нататък методи за микробиологичен анализ и хранителните среди са стандартни и са описани в литературата [11—14]

Микробиологични изследвания на взетите проби


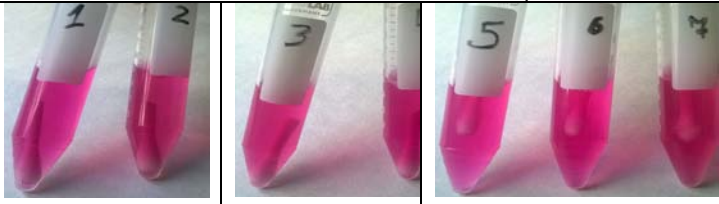
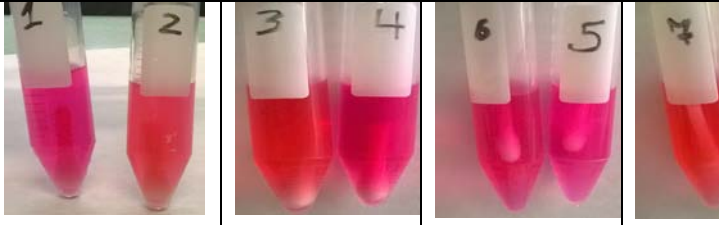
Изследване за набогатяване на течна хранителна среда и върху твърди хранителни среди.

Извършени са натривки със стерилен овлажнен тампон, които са внесени в богата течна хранителна среда DMEM (без антибиотик) и са инкубирани при 30°C. През 24 часа в продължение на 14 денонощия е отчитано изменението в мътността и оцветяването на средите (фиг. 4). установено е, че при проба 7 още на 48^{ми} час се наблюдава помътняване на средата с изменение на оцветяването, а на 120^{ти} час помътняване с формиране на утайка и изменение в оцветяването се наблюдава и при проби 2 и 3.

Успоредно за всяка една от позициите са извършени натривки със стерилен овлажнен тампон и са инокулирани повърхностно на три вида хранителни среди в две повторения с цел развитие на микроорганизми от групата на плесените (КДА), дрождите и актиномицетите (МЕА) и бактериите (МПА). Пробите са инкубирани при два различни температурни режима – при 30°C и 15°C, с цел развитие на предполагаема психрофилна или мезофилна микрофлора. На определени часове е отчетено наличието или отсъствието на растеж от изследваните проби при двата температурни режима за период от 14 дни.

Установено е, че при 15°C за период от 14 дни при всички варианти на твърди хранителни среди не се наблюдава развитие на микроорганизми. При температурен режим 30°C върху твърди хранителни среди повърхностно развитие на колонии е отчетено само при проба 7 на среда МЕА, подходяща за развитие на дрожди и някои актиномицети. Получените резултати са показани на фигура 4.

Обобщено за изследваните позиции е установено развитие на микрофлора в проби 2, 3 и 7 на течна среда при 30°C и в проба 7 на твърда среда МЕА при 30°C.

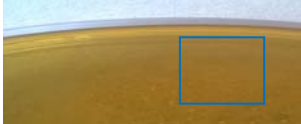
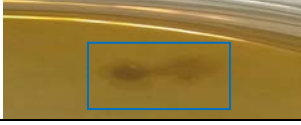
час	Инкубиране на среда DMEM (без антибиотик) при 30°C						
0 час (вземане на пробите)							
48 час							
резултат	-	-	-	-	-	-	+/-
120 час							
резултат	-	+	+	-	-	-	+

192 час							
резултат	-	+	+	-	-	-	+
14 ден	Аналогични резултати						
резултат	При проби 2, 3 и 7 се наблюдава помътняване на средата, формиране на утайка и промяна в оцветяването.						

Фиг. 4

На фигура 4 са показани резултати от изследване на пробите в течна среда DMEM при 30°C, като:

- отсъствие на растеж; +/- минимален растеж с лека промяна на цвета на средата; + наличие на растеж с утайка на дъното на епруветките.

час	Проби на различни типове твърди хранителни среди			
	КДА	МПА	МЕА	
48 час.	-	-	Проба 7 +	
120 час.	-	-	Проба 7 +	
192 час.	-	-	Проба 7 +	
14 ден	Аналогичен резултат			
резултат	Само при проба 7 се наблюдава развитие на колонии на среда МЕА.			









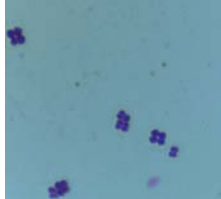
Фиг. 5

На фигура 5 са показани резултати от изследваните проби на твърди хранителни среди при 30°C.

Изследване на проби 2, 3 и 7, набогатени в течна хранителната среда и охарактеризирането им по Грам.

От проби 2, 3 и 7, в които има развитие на микроорганизми (помътняване и формиране на утайка) са заложили серия от експерименти с щрихов посев на твърди хранителни среди и култивиране при 30°C. Резултатите от култивирането на пробите върху твърди хранителни среди са отчитани на всеки 72 часа в рамките на 10 дни. При всяка от пробите се наблюдава развитие на хомогенни колонии само на среда МПА. Успоредно са направени свежи и трайни, оцветени по Грам микроскопски препарати на трите проби с развитие на микроорганизми. Получените резултати са представени на фигура 6.

И при трите проби, изследвани с този метод (2, 3 и 7), се наблюдава развитие на среда МПА, подходяща за развитието на бактериални култури. Въз основа на микроскопските препарати може да се посочи, че в трите проби са изолирани три различни бактериални култури – две коковидни и една пръчковидна Грам + бактерии.

Изследвана проба	Растеж на твърда хранителна среда	Свежи микроскопски препарати	Оцветяване по Грам
Проба 2	 Развитие на среда МПА	 Хомогенна култура от коковидни (сферични) клетки, предимно групирани по двойки.	 Грам+
Проба 3	 Развитие на среда МПА	 Хомогенна култура от летки с пръчковидна форма (средни до дълги пръчици), подвижни.	 Грам+
Проба 7	 Развитие на среда МПА	 Хомогенна култура от коковидни (сферични) клетки, групирани основно по четворки.	 Грам+

Фиг. 6

На фигура 6 са показани макро- и микроскопски характеристики на развитите микробни култури от проби 2, 3 и 7 набогатени в течна хранителната среда.

Предоставената проба за изследване от МКС и съответните торби за съхранение, според стандартната процедура, бяха стерилизирани чрез автоклавиране с цел унищожаване на съществуващата микрофлора в продължение на 1,5 часа при температура $121^{\circ}\text{C}\pm 2$. Така стерилизирана проба бе предадена от екипа от БАН за по-нататъшните структурни и механични изпитания на изложените в космоса образци, които ще бъдат предмет на други публикации.

Изводи и препоръки:

Така направените биологични изследвания водят до следния извод: Неспецифичните условия на развитие на изолатите и микроскопските морфологични характеристики на микроорганизмите в проби 2, 3 и 7 предполагат по-скоро случайно и неспецифично контаминиране на цялостната проба в процеса на прехвърляне, идентификация и обработка след доставяне от МКС. Основна причина за това е фактът, че при подготовката на блок ДП-ПМ все още нямаше условие процедурата за качване и сваляне на блока да е съобразена с възможността за микробиологично изследване на образците.

МКС дава уникалната възможност изнасянето и излагането на оборудване на повърхността на станцията да се използва, освен за основната му задача, и като „контейнер“ за неизбежните по повърхността му земни микроорганизми. Затова е целесъобразно в ИКИТ-БАН процедурите за изнасяне и внасяне на оборудване в космоса да осигуряват тази възможност. За тази цел оборудването би трябвало да се транспортира до орбита и до космоса по такъв начин, така че да е изолирано от атмосферата на МКС; след сваляне от повърхността на МКС, преди да се внесе в МКС, то трябва отново да се изолира – до момента на отваряне от квалифицирани микробиолози. По този начин лесно би могло да се изследва какво става с различни земни микроорганизми, изложени на екстремалните условия на космоса.

Литература:

1. Klaus, D. M. and Howard, H. N., Antibiotic efficacy and microbial virulence during space flight, *Trends in Biotechnology*, 2006, 24 (3), pp. 131–136
2. Rosenzweig JA, Ahmed S, Eunson J Jr, Chopra AK, Low-shear force associated with modeled microgravity and spaceflight does not similarly impact the virulence of notable bacterial pathogens, *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014, 98(21): 8797-807.
3. Checinska A, Probst AJ, Vaishampayan P, White JR, Kumar D, Stepanov VG, Fox GE, Nilsson HR, Pierson DL, Perry J, Venkateswaran K, Microbiomes of the dust particles collected from the International Space Station and Spacecraft Assembly Facilities, *Microbiome*. 2015; 3:50.
4. Mora M, Perras A, Alekhova TA, Wink L, Krause R, Aleksandrova A, Novozhilova T, Moissl-Eichinger C, Resilient microorganisms in dust samples of the International Space Station-survival of the adaptation specialists, *Microbiome*. 2016, 20; 4(1):65.
5. Knox BP, Blachowicz A, Palmer JM, Romsdahl J, Huttenlocher A, Wang CC, Keller NP, Venkateswaran K, Characterization of *Aspergillus fumigatus* Isolates from Air and Surfaces of the International Space Station, *mSphere*. 2016; 1(5). pp. e00227-16.
6. Klintworth, R. and Reher, H. J., Biological induced corrosion of materials II: New test methods and experiences from Mir station, *Acta Astronautica*, 1999, 44(7-12):569-78.
7. Gunter, D., Flores, G., Effinger, M., Maule, J., Wainwright, N., Steele, A., Damon, M., Wells, M., Williams, S., Morris, H. and Monaco, L., Rapid Monitoring of Bacteria and Fungi aboard the International Space Station (ISS), NASA Technical Reports Server (NTRS), 2009, <http://naca.larc.nasa.gov/search.jsp?R=20090017684&q=N%3D4294950110%2B4294848119>
8. Project MERCCURI, NASA, <http://spacemicrobes.org/>
9. Сыроешкин, А. В., Т. В. Гребенникова, В. Б. Лапшин, А. Г. Южаков, Г. В. Садыкова, О. С. Цыганков, Е. В. Шубралова, В. А. Шувалов, М. А. Морозова, М. А. Чичаева, А. В. Головки, Бактерии Мирового океана и суши Земли в космической пыли на международной космической станции: панспермия или ионосферны „лифт“, гелиогеофизические исследования выпуск 5, 2013, Исследования средней и верхней атмосферы, взаимодействия геосфер, 124 – 132, УДК 550.47
10. Tina Šantl-Temkiv, Kai Finster, Thorsten Dittmar, Bjarne Munk Hansen, Runar Thyrhaug, Niels Woetmann Nielsen, Ulrich Gosewinkel Karlson, Hailstones: a window into the microbial and chemical inventory of a storm cloud, 2013, *PloS one*, Volume 8, Issue 1, Pages e53550
11. Estatieva, Y., Nikolova D., Teofilova P., Ilieva S., Savov V., Characterization of Enzyme Endoxylanase Produced by Mutants Strains of *Aspergillus Awamori* K-1, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23: sup1, 914-918
12. Estatieva, Y., Nikolova D., Ilieva S., Getov L., Savov V., Identification and Characterization of α - Amylase and Endoxylanase, Produced by *Aspergillus* Mutant Strains, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24: sup1, 613-617
13. Bratkova, S., Nikolova D., Evstatieva Y., Dimitrov I., Nikolova K., Analysis of rrizospheric bacterial community in soils affected by the formation of calcrete, *Journal of Geochemical Exploration*, pp. 44-50
14. Georgieva, T., Nikolova D., Estatieva Y., Licheva Ts., Savov V., Growth characteristics of *pseudomonas putida* strains and effect of humic substances on cell density during batch cultivation, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2014, pp. 82-86