

УДК 579.66.083.1.088.1:620.193.8

**Л. И. Антоновская**, ассистент (БГТУ);**Н. А. Белясова**, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ)**ВЫБОР МЕТОДОВ, УСЛОВИЙ ИСПЫТАНИЙ И ПАРАМЕТРОВ ОЦЕНКИ  
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Установлено, что диффузионные методы оценки антибактериальных свойств веществ непригодны для анализа сложных по составу композиций и различающихся по молекулярной массе препаратов. Предложен наиболее приемлемый параметр оценки антибактериальных свойств препаратов в суспензионном методе – фактор редукции. Доказано, что биоцидная активность препаратов напрямую зависит от численности бактериальных суспензий и полное уничтожение клеток под действием эффективных биоцидов достигается лишь при содержании бактерий в инокуляте менее  $10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>, что следует учитывать в соответствующих методиках. Выявленные закономерности нужно иметь в виду при разработке мероприятий по борьбе с биологическим обрастанием материалов и микробной контаминацией объектов.

It was elicited, that diffusive methods of assessment of materials antimicrobial properties are unsuited to analysis of compound samples according to its composition formulation and various molecular mass. The most acceptable characteristic of assessment of materials antimicrobial properties in suspension method – the factor of reduction was offered. It was asserted that biocidal activity of specimen depends directly on the quantity of bacterial suspension and the complete demolition of cells under the effective biocide can be achieved only containing the bacteria in inicum less than  $10^4$  CFU/sm<sup>3</sup>, that should be taken into account for similar techniques. The regularities elicited should be considered during the development of arrangements against biofouling of materials and microbial contamination of objects.

**Введение.** На первых этапах работы по определению антибактериальных свойств разнообразных биоцидных препаратов, синтезированных в различных научных институтах Республики Беларусь и за рубежом, мы столкнулись с методическими трудностями. Оказалось, что стандартизированного метода оценки антибактериальных свойств биоцидных препаратов в нашей Республике не существует, а описанные в научной литературе способы часто дают противоречивые результаты.

Цель работы: произвести сопоставительную оценку используемых методов определения антибактериальных свойств различных биоцидных препаратов, выявить их недостатки и совершенствовать, а также выработать рекомендации по разработке мероприятий при борьбе с биологическими обрастаниями материалов и микробной контаминацией объектов.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили синтезированные в ГНУ «Институт химии новых материалов» НАН Беларуси биоцидные композиции на основе производных полигексаметиленгуанидина (ПГМГ) и четвертичных аммонийных соединений (ЧАС), а также некоторые низкомолекулярные вещества, чей состав не раскрыт разработчиками.

В качестве тест-культуры использовали выделенные из состава биообрастаний бактерии *Pseudomonas aeruginosa* P-C [1].

Среди методов оценки антибактериальных свойств биоцидных веществ наиболее широко

используемыми являются диффузионный и суспензионный.

Схема диффузионного метода: определенный объем суточной тест-культуры вносили в расплавленную и остуженную до 46°C полужидкую питательную среду, быстро перемешивали и выливали на слой застывшей и подсушенной плотной питательной среды. На поверхности инокулированной среды размещали пластиковые цилиндрики, в которые вносили анализируемые растворы биоцидных агентов. Один час выдерживали посевы в холодильнике, затем перемещали в термостат и инкубировали сутки. После инкубирования измеряли линейкой с миллиметровой шкалой диаметр зон ингибирования роста тест-культур.

Схема суспензионного метода: исследуемые биоцидные вещества в различных концентрациях подвергали совместному инкубированию в жидкой питательной среде с тест-культурой бактерий и контролировали степень мутности суспензий, которая является показателем концентрации клеток. Регистрировали минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) биоцида, при которой не наблюдается мутность в культуральной жидкости. Из суспензии с МИК производили высев бактерий на плотные питательные среды подходящего состава. Подсчитывали число изолированных колоний и определяли концентрацию жизнеспособных клеток (КОЕ/см<sup>3</sup>), учитывая фактор разведения суспензий. Биоцидные свойства веществ (способность обуславливать гибель клеток) оценивали с помощью

параметра «выживаемость» ( $B$ ), определяемого по формуле

$$B = \frac{K_1}{K_0} \cdot 100(\%), \quad (1)$$

где  $K_1$  – концентрация жизнеспособных клеток, обработанных биоцидным веществом, КОЕ/см<sup>3</sup>;  $K_0$  – исходная концентрация клеток в инокуляте, КОЕ/см<sup>3</sup>.

**Результаты и их обсуждение.** В таблице систематизированы данные по определению антибактериальной активности биоцидных композиций двумя методами: диффузионным и суспензионным.

**Антибактериальные свойства биоцидных композиций по отношению к тест-бактериям *Pseudomonas aeruginosa* P-C**

Биоцидная композиция	Диаметр зон задержки роста бактерий в диффузионном методе, мм	Показатели суспензионного метода	
		МИК, %	Выживаемость клеток в присутствии 0,05% биоцида, %
1d	10,0 ± 1,4	0,005	36,0 ± 3,7
3d	18,0 ± 2,3	0,050	96,3 ± 11,7
7d	15,0 ± 1,9	0,010	91,3 ± 10,4
8d	12,5 ± 1,8	0,004	12,0 ± 1,9
9d	16,0 ± 1,9	0,003	0,2 ± 0,1
11d	18,0 ± 2,7	0,003	0,8 ± 0,1

*Примечания:* 1. В таблице отражены средние арифметические результатов единичных анализов, полученные в условиях повторяемости.

2. Концентрация клеток в инокуляте в суспензионном методе составляла ~ 10<sup>4</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>.

Анализируя приведенные в таблице данные, можно заметить, что показатели суспензионного метода строго соответствуют друг другу: с увеличением минимальной ингибирующей концентрации биоцидных композиций увеличивается выживаемость клеток в суспензии, содержащей биоциды в концентрации 0,05%. В то же время показатели диффузионного метода не во всех случаях коррелируют с результатами суспензионного метода: например, биоцидная композиция 3d в диффузионном методе обеспечивает формирование одних из самых широких зон задержки роста тест-бактерий, хотя в суспензионном методе проявила себя как наименее активная. Такое же несоответствие характерно для композиции 7d. Объяснением может служить то обстоятельство, что в составе данных композиций присутствуют низкомолекулярные биоцидные ингредиенты, скорость диффузии которых в полужидком геле агар-агара гораздо выше ско-

рости диффузии крупных полимерных молекул производных ПГМГ. Другим объяснением наблюдаемого феномена может служить то, что в составе композиций 3d и 7d производные ПГМГ и ЧАС слабо связаны друг с другом, а в остальных композициях их взаимодействие приводит к ограничению диффузии низкомолекулярных ЧАС в агаризованной среде.

Отмеченные обстоятельства накладывают определенные ограничения на использование диффузионного метода для анализа антимикробных свойств различающихся по молекулярной массе и сложных по составу препаратов.

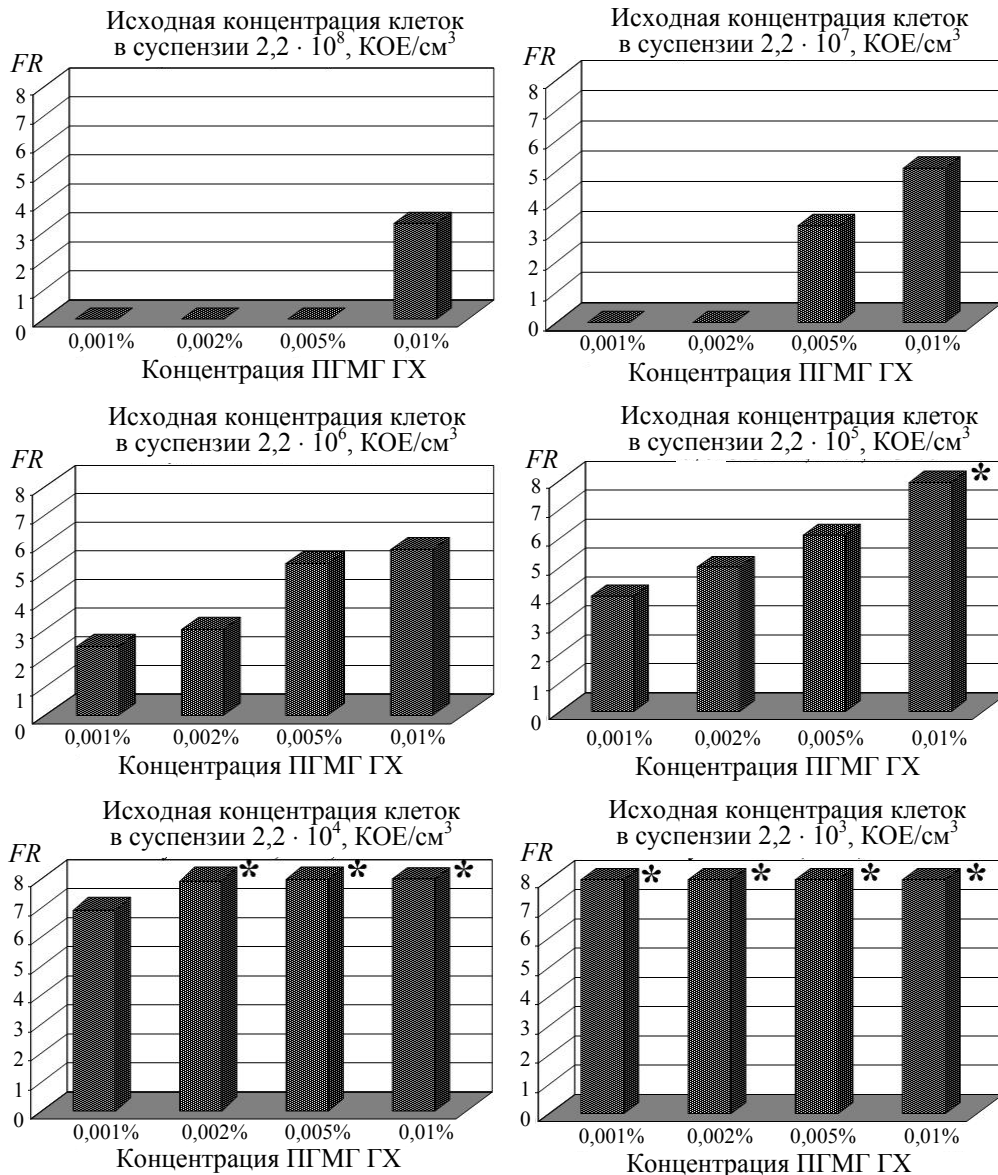
Из данных таблицы также следует, что наиболее активные препараты 9d и 11d характеризуются очень низкими и одинаковыми показателями МИК (0,003%) в использованных условиях, что не позволяет их дифференцировать. В то же время, согласно выживаемости клеток в присутствии биоцидов, препарат 9d активнее обеспечивает гибель бактерий, чем препарат 11d. Можно заключить, что наиболее значимым параметром суспензионного метода для оценки свойств близких по антимикробной активности препаратов является выживаемость.

В то же время данный показатель не очень удобен, поскольку, согласно современным требованиям к эффективным биоцидам, они должны обеспечивать уменьшение исходного числа клеток не менее чем на 2 порядка [2], а по другим оценкам – на 5 порядков [3]. В таком случае выживаемость клеток в контроле и опыте должна изменяться в пределах от 100 до 0,01%. Столь широкий диапазон значений выживаемости делает затруднительным построение графических зависимостей. К тому же, чтобы определить возможность снижения исходного числа клеток в инокуляте на 5 порядков, следует использовать суспензии с исходным числом клеток более 10<sup>6</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>, поскольку минимально регистрируемая концентрация клеток в методе высева на плотные среды составляет 10<sup>1</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Как будет показано далее, 10<sup>6</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> – слишком высокая концентрация клеток в инокуляте для адекватной характеристики биоцидов.

Учитывая перечисленные обстоятельства, предлагаем для оценки бактерицидных свойств препаратов использовать другой параметр – фактор редукции ( $FR$ ) в следующей его интерпретации:

$$FR = \log \left( \frac{K_2}{K_1} \right) \quad (2)$$

где  $K_1$  – концентрация жизнеспособных клеток после инкубирования в присутствии биоцидного препарата, КОЕ/см<sup>3</sup>;  $K_2$  – концентрация жизнеспособных клеток в питательной среде без биоцида (контроль), КОЕ/см<sup>3</sup>.



Зависимости фактора редукции от концентрации ПГМГ ГХ при разной численности бактерий *Pseudomonas aeruginosa* P-C в инокуляте:

\* – концентрация жизнеспособных бактерий в суспензии после инкубирования с ПГМГ ГХ не превышала  $10^1$  КОЕ/см<sup>3</sup>, т. е. фактор редукции приближается к максимальному значению

На рисунке приведены зависимости  $FR$  от концентрации полигексаметиленгуанидина гидрохлорида (ПГМГ ГХ), который является основой большинства испытанных в работе биоцидных препаратов, по отношению к тест-бактериям *P. aeruginosa* P-C.

В шести параллельных экспериментах использованы суспензии клеток, содержащие от  $2,2 \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup> до  $2,2 \cdot 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>, полученные в ходе 10-кратных разведений суточной культуры в питательном бульоне. Длительность инкубирования суспензии с биоцидным препаратом составляла 24 ч, контролем служили аналогичным образом подготовленные суспензии, не содержащие биоцидов.

Из приведенных на рисунке диаграмм следует, что биоцидная активность ПГМГ ГХ в очень

сильной степени зависит от числа клеток в инокуляте. Фактически полное подавление роста и уничтожение всех жизнеспособных клеток достигается лишь для суспензий, содержащих не более  $2,2 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Для более концентрированных суспензий фактор редукции не превышает 7,5 даже в присутствии 0,01% биоцида. Стоит отметить, что в большинстве публикаций, посвященных свойствам коммерческих препаратов ПГМГ ГХ («Полисефт», «БИОПАГ» и др.), в качестве биоцидной концентрации, обеспечивающей полное уничтожение жизнеспособных клеток разнообразных санитарно-показательных бактерий, называется 0,002%, хотя при этом авторы не указывают, в отношении каких по плотности клеток суспензий оценивали выживаемость [4, 5].

Анализируя представленные на рисунке данные и результаты подобных экспериментов с другими биоцидными препаратами и тест-бактериями, мы заключаем, что для адекватной оценки биоцидной активности препаратов следует использовать суспензии, численность клеток в которых не превышает  $10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>. В более концентрированных суспензиях отдельные особи популяции сохраняют выживаемость даже при относительно высоком содержании биоцидных препаратов, т. е. биоцидные свойства веществ «маскируются». В частности, заявленная разработчиками ПГМГ ГХ биоцидная активность (0,002%) достигается только в суспензии бактерий *P. aeruginosa* P-C, содержащей  $2,2 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Увеличение степени устойчивости бактерий к биоцидам при увеличении численности их популяции можно объяснить существованием механизма *quorum sensing*, который заключается в активации транскрипции определенных генов и повышении концентрации их продуктов в ответ на достижение бактериальными популяциями определенной плотности [6]. В частности, в литературе встречаются сведения об использовании явления *quorum sensing* бактериями *P. aeruginosa*, которые по достижении популяцией определенной плотности начинают синтезировать специфические полисахариды, защищающие клетки от проникновения в них антибиотиков, обеспечивающие формирование биопленок и повышающие вирулентность [6].

С позиции механизма *quorum sensing* можно объяснить полученные в работе данные относительно зависимости биоцидной активности ПГМГ ГХ от содержания клеток в инокуляте. Действительно, в суспензиях *P. aeruginosa* P-C с концентрацией  $2,2 \cdot 10^1$ – $2,2 \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> регистрировались одинаковые биоцидные свойства препарата, т. е. все клетки в популяциях при любом содержании ПГМГ ГХ погибали. Однако уже в суспензии с  $2,2 \cdot 10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup> в присутствии 0,001–0,005% ПГМГ ГХ часть бактерий сохраняла жизнеспособность (фактор редукции не достигал максимального значения). По мере увеличения численности клеток в инокулятах фактор редукции, отражающий биоцидные свойства ПГМГ ГХ, постепенно снижался, и в суспензиях *P. aeruginosa* P-C с концентрацией  $2,2 \cdot 10^7$ – $2,2 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup> довольно активный ПГМГ ГХ [4, 5] в концентрации 0,002–0,005% вообще не обеспечивал уменьшение числа жизнеспособных клеток по сравнению с контролем.

**Заключение.** Таким образом, произведен сопоставительный анализ используемых методов определения антибактериальных свойств различных биоцидных препаратов, выявлены их недостатки и предложен новый параметр – фактор редукции, который более объективно позво-

ляет оценить антибактериальные свойства биоцидных препаратов в суспензионном методе.

Получены и проанализированы зависимости биоцидной активности препаратов от их концентрации при разной численности бактерий в инокуляте.

Выявленные закономерности должны учитываться при разработке мероприятий по борьбе с биологическим обрастанием материалов и микробной контаминацией объектов. В частности, следует вначале снизить численность клеток в (на) объекте, по меньшей мере, до  $10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup>, и лишь затем имеет смысл использовать биоцидные препараты. Что касается биологического обрастания материалов и изделий, то самым эффективным способом борьбы с ними должно стать предотвращение их развития. Попытки уничтожить микроорганизмы, уже сформировавшие биообрастания, численность клеток в которых превышает  $10^5$  КОЕ/см<sup>3</sup>, с помощью биоцидных препаратов не будут иметь успеха.

### Литература

1. Антоновская, Л. И. Выделение и идентификация микроорганизмов из состава биообрастаний половолоконных ультрафильтрационных мембранных элементов / Л. И. Антоновская, А. П. Райский, Н. А. Белясова // Научные стремления – 2010: сборник материалов Республиканской научной конференции с международным участием, Минск, 1–3 нояб. 2010 г. / Национальная академия наук Беларуси; редкол.: В. В. Казбанов [и др.] – Минск, 2010. – Ч. 2. – С. 449–452.
2. Противомикробные изделия – тест на противомикробную активность и эффективность: японский промышленный стандарт JIS Z 28001. – Введ. 20.12.2000. – Токио: Японская ассоциация стандартов, 2001. – 15 с.
3. Временная инструкция «Методы испытания противомикробной активности дезинфицирующих средств»: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 24.12.1998. – Минск: БелНИИЭМ, 1998. – 8 с.
4. Антимикробные свойства нового дезинфицирующего препарата «Полисепт-ОП» / Л. С. Кузнецова [и др.] // Мясная индустрия. – 1998. – № 7. – С. 20–22.
5. Способ получения дезинфицирующего средства: пат. 2122866 Рос. Федерация МПК7 А 61 L 2/16, 2/18, С 07 С 279/00 / П. А. Гембицкий [и др.]; заявитель П. А. Гембицкий. – № 98106343, заявл. 30.10.91; опубл. 10.12.98 // Официальный бюл. / Российское агентство по патентам и товарным знакам. – 1998. – № 34. – С. 16.
6. Brock biology of microorganisms: 12th ed. / M. T. Madigan [et al.]. – San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2009. – 1061 с.

Поступила 07.03.2011