

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ БИОЦИДНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПОВЕРХНОСТНУЮ МИКРОФЛОРУ

The article is devoted to analysis of biocides action at microorganisms on the surfaces of materials. The aim of work is a development of express-method for estimation of surfaces' microorganisms resistance to antimicrobial substances. In the result of fulfilled research it were shown the possibilities of application an optical method, substances diffusion in agar media method and bio-calorimetric method for estimation of bacteria resistance to biocides. It was proposed bio-calorimetric method for analysis of microorganism's condition at surfaces of silicate materials during 1–2 hours.

Введение. Проблема борьбы с патогенной и технически вредной микрофлорой является одним из важных направлений ресурсосбережения и предотвращения потерь, связанных с биоповреждениями сырья, материалов, изделий и конструкций, а также нарушением здоровья человека.

Широко распространенным способом борьбы с вредными микроорганизмами является использование антимикробных веществ, обладающих биостатическим или биоцидным действием. В случае биостатического эффекта размножение микроорганизмов замедляется или прекращается, но клетки не погибают и продолжают метаболизировать. При биоцидном воздействии численность жизнеспособных клеток уменьшается.

К антимикробным веществам предъявляется ряд общих требований:

- высокая активность и эффективность действия против микроорганизмов деструкторов и патогенов;
- низкая токсичность для человека и безопасность для окружающей среды;
- низкая адаптируемость микроорганизмов;
- хорошее взаимодействие с поверхностью материалов и пролонгированное сохранение своих свойств;
- низкая стоимость.

Основная проблема антимикробных препаратов связана с быстрым снижением их активности и эффективности действия против микроорганизмов с увеличением времени использования. Причина этого обусловлена адаптацией клеток и повышением их резистентности. Это вызывает необходимость своевременного обнаружения роста резистентности микрофлоры и чередования применения антимикробных веществ, а также расширения ассортимента их выпуска.

В настоящее время на рынке Республики Беларусь присутствует большой перечень различных антимикробных средств отечественного и зарубежного производства [1]. Однако они больше отличаются торговым названием, чем природой антимикробных веществ. Поэтому использование по сути одних и тех же антимикробных препаратов, хотя и с разным торго-

вым названием, приводит к бесполезности их применения и даже усиливает рост и деструктирующую активность микроорганизмов.

Это делает проблему контроля активности и эффективности действия антимикробных веществ одной из ключевых задач их правильного использования.

Существует множество методов анализа содержания и жизнеспособности микроорганизмов в водных средах [2], однако способы контроля состояния микроорганизмов на поверхности материалов и изделий недостаточно разработаны. Вместо анализа развития клеток на поверхности материалов часто применяется методический прием взятия смывов микроорганизмов с анализируемой поверхности. Оценка содержания и активности выделенной микрофлоры проводится уже в водной среде. Такая замена не всегда адекватно отражает поведение микроорганизмов в реальных условиях.

Основная часть. Цель работы – разработка экспресс-метода оценки состояния микроорганизмов на поверхности материалов при воздействии антимикробных веществ.

В работе использовали чистые культуры клеток микроорганизмов *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Суточные культуры исследуемых бактерий разводили свежим питательным бульоном (ПБ) в 4 раза и выдерживали при 30°C в течение 2 ч. Количество жизнеспособных клеток определяли методом посева разведений на чашки с агаризованной питательной средой (ПА). После культивирования бактерий в термостате при 30°C на протяжении 3 сут считывали начальную концентрацию клеток в соответствии с [3].

Анализируемыми объектами служили образцы силикатных материалов, приготовленные в лабораторных условиях. Для получения образцов использовали сухую смесь кладочного раствора для кирпичей и бетонных блоков производства ОАО «Красносельскстрой». К 3 г навески сухой смеси добавляли 0,5–1,0 см³ водной среды. Смесь перемешивали до однородной консистенции, помещали в разборную ячейку микрокалориметра, выдерживали до ее

застывания и при необходимости стерилизовали в автоклаве при 120°C в течение 15 мин.

На поверхность приготовленных образцов наносили 0,1–0,3 см³ чистой культуры микроорганизмов в диапазоне концентраций 10⁵–10⁹ кл./см³, а также раствор биоцида с концентрацией 0,1–0,5% или физиологический раствор (ФР).

В качестве антимикробных веществ использовали препараты отечественного производства: «Септомирин», «Гефал», «Изотрон», «Хлоргексидин» (ОАО «Белмедпрепараты»); «Интрасепт-10А» (ИП «Инкраслав»).

После нанесения культуры клеток на поверхность стерильного силикатного материала, обработанного биоцидом, образцы выдерживались в термостате при 30°C на протяжении 1 сут. На следующий день проводился смыв микроорганизмов с поверхности увлажненным стерильным ватным тампоном. Тампон помещали в ФР, готовили десятикратные разведения и высевали последние разведения на поверхность ПА. После культивирования клеток в термостате подсчитывали число выросших колоний и рассчитывали поверхностную концентрацию микроорганизмов как

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

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.

Изучение действия антимикробных препаратов на чистые культуры бактерий и микроорганизмы в смывах с поверхности материалов проводилось в одинаковых условиях.

Активность биоцидов определяли методом диффузии веществ в ПА в соответствии с [4]. На поверхность застывшего ПА наносили по 0,1 см³ суспензии тест-культуры микроорганизмов в концентрации 10⁷ кл./см³ и равномерно распределяли с помощью стерильного шпателя по поверхности агара. Затем укладывали стерильные диски фильтровальной бумаги, пропитанные в растворах биоцидов в диапазоне концентраций 0,001–0,1%. Чашки помещали в термостат при температуре (30 ± 1)°C на 24 ч. После инкубирования измеряли диаметры зон задержки роста клеток вокруг дисков.

Ростовую активность бактерий в присутствии различных концентраций биоцидов оценивали по изменению оптической плотности D_{600} от времени. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-16. Для этого к 9 см³ суточной культуры бактерий, содержащих 10⁷ кл./см³, добавляли 1 см³ антисептиков «Изотрон», «Септомирин» в концентрациях 0,01–0,05%. Контрольными образцами служили клетки с добавками ФР вместо анти-

септиков. Через каждые 30 мин отбирали пробы и измеряли оптическую плотность растворов при $\lambda = 600$ нм в течение 8 ч.

Измерение тепловыделения микроорганизмов на поверхности материалов выполняли на микрокалориметре МКМ-Ц в соответствии с [5]. На образцы силикатных материалов наносили чистые культуры бактерий *Bacillus subtilis* или *Pseudomonas fluorescense* в ПБ в концентрациях 10⁴–10⁸ кл./см². Образцы обрабатывали антисептиком «Интрасепт-10А» в концентрациях 0,1–0,5% или ФР. После загрузки проб в микрокалориметр регистрировали мощность тепловыделения поверхностной микрофлоры на протяжении 2–3 ч.

Результаты измерений обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Одним из наиболее часто применяемых методов для определения активности антимикробных препаратов является способ диффузии веществ в агар.

Оценка активности антимикробных препаратов данным методом проводится по диаметру зоны подавления роста микроорганизмов на поверхности ПА (таблица).

Таблица

**Диаметры зон подавления
роста микроорганизмов в зависимости
от концентрации антимикробных веществ**

Анти- микробное вещество	Концен- трация, %	Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов, мм			
		<i>E. coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		1	2	1	2
«Хлоргексидин» (ХГ)	0,012	12	4	11	2
	0,006	2	0	3	0
	0,003	0	0	0	0
«Гефал»	0,04	5	1	7	2
	0,02	3	0	4	0
	0,01	0	0	0	0
«Септомирин»	0,005	6	2	7	2
	0,003	4	1	6	1
	0,001	0	0	0	0

Примечание. 1 – активность подавления биоцидами исходной культуры; 2 – активность подавления биоцидами бактерий в смывах с поверхности силикатного материала через 1 сут.

Чем меньше концентрация веществ и выше диаметр зон отсутствия роста микроорганизмов, тем более активен препарат.

По силе действия используемые антимикробные средства можно расположить в ряд: «Септомирин» > ХГ > «Гефал».

О повышении резистентности клеток на поверхности материалов к применяемому

антимикробному веществу можно судить по снижению диаметра зон подавления роста бактерий после посева смывов с поверхности на ПА в присутствии дисков с той же рабочей концентрацией биоцида (таблица).

Достоинствами метода являются простота, наглядность, низкие затраты. К недостаткам способа следует отнести относительную длительность (сутки и более), невозможность анализировать полимерные антисептики.

Другим методом оценки активности антимикробных веществ в лабораторных условиях является спектрофотометрический способ.

На рис. 1 приведена кинетика изменения относительного значения оптической плотности $(D/D_0)_{600}$ клеток *Pseudomonas aeruginosa* до и после взятия смыва с поверхности силикатного материала. Кинетика изменения оптической плотности отражает степень влияния биоцидного вещества на ростовую активность клеток в жидкой питательной среде.

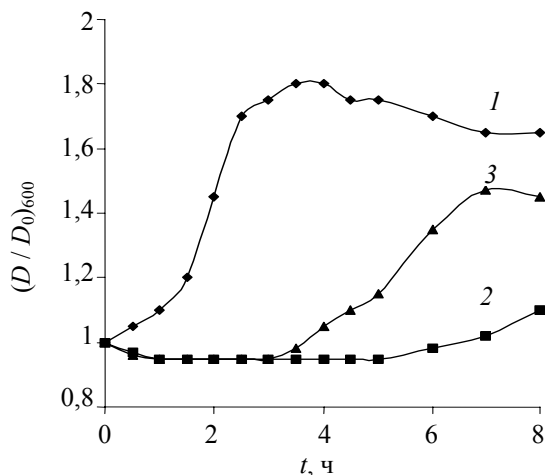


Рис. 1. Влияние антисептика «Изотрон» на рост бактерий *Pseudomonas aeruginosa*:

- 1 – контроль без биоцида;
2 – образец с биоцидом в ПБ концентрации 0,03%;
3 – образец с биоцидом через 1 сут после взятия смыва с поверхности силикатного материала, обработанного биоцидом концентрацией 0,03%

Как следует из рис. 1, биоцидную активность и эффективность препарата можно оценить по увеличению лаг-фазы задержки роста клеток и уменьшению количества жизнеспособных микроорганизмов по сравнению с контрольным образцом, регистрируемому по снижению величины $(D/D_0)_{600}$ от времени обработки.

Присутствие биоцида в концентрации 0,03% в исходной культуре клеток увеличивало лаг-фазу бактерий почти в 8 раз (рис. 1, кривая 2). В случае воздействия той же концентрации биоцида на бактерии в смывах с поверхности длительность лаг-фазы сокращалась до 4 ч (рис. 1,

кривая 3). Это свидетельствует о повышении резистентности микроорганизмов на поверхности силикатного материала.

Метод спектрофотометрии быстр, удобен, но не всегда применим в случае слишком мутных сред и относительно низкого содержания микроорганизмов (ниже 10^6 кл./см³), а также не подходит для непосредственного анализа поверхностной микрофлоры.

Для характеристики влияния биоцидных веществ на жизнедеятельность микроорганизмов на поверхности силикатных материалов нами был предложен метод биокалориметрии, основанный на регистрации мощности тепловыделения жизнеспособных микроорганизмов.

На рис. 2 приведены логарифмические термограммы роста бактерий *Pseudomonas fluorescens* на поверхности застывшего кладочного раствора в кюветах микрокалориметра в отсутствии и в присутствии антисептика «Интрасепт-10А».

Как видно из рис. 2, наблюдается быстрая (I) фаза изменения тепловыделения, отражающая переходные процессы и адаптацию клеток к материалу, и медленная (II) фаза, характеризующая ростовые процессы клеток на поверхности материала в отсутствии и в присутствии антисептиков.

О влиянии антимикробных веществ на ростовую активность микроорганизмов в иммобилизованном состоянии в биокалориметрическом методе можно судить по изменению удельной скорости тепловыделения клеток после завершения переходного процесса (рис. 2, кривая 2). Видно, что антисептик «Интрасепт-10А» подавляет развитие бактерий *Pseudomonas fluorescens* на поверхности материала при выбранных условиях обработки.

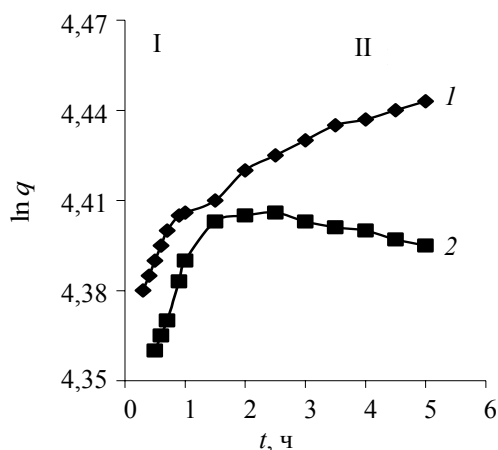


Рис. 2. Термограммы развития бактерий рода *Pseudomonas fluorescens* (10^7 кл./см²) на поверхности застывшего кладочного раствора:

- 1 – без антисептика;
2 – с антисептиком «Интрасепт-10А» концентрацией 0,5% при 30°C

Изменение логарифма относительного тепловыделения микроорганизмов (рис. 3) хорошо описывается линейным уравнением и коррелирует с удельной скоростью размножения клеток:

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

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

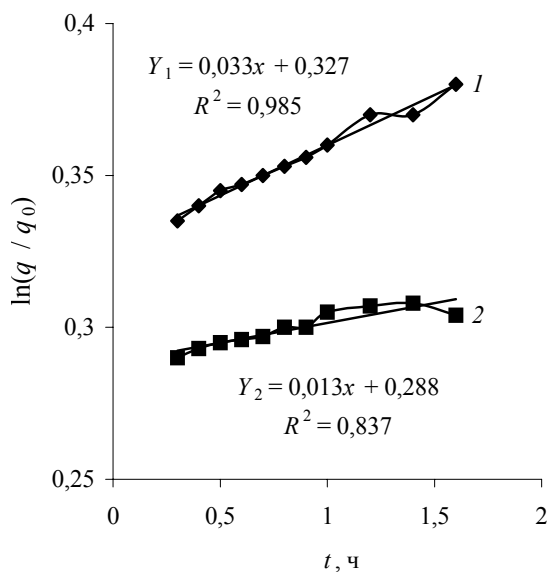


Рис. 3. Изменение логарифма относительного значения тепловыделения $\ln(q/q_0)$ бактерий *Bacillus subtilis* на поверхности застывшего кладочного раствора:
1 – без антисептика;
2 – с антисептиком «Интрасепт-10А» концентрацией 0,5% при 30°C

Это позволяет в течение 1–2 ч определить ростовую активность клеток на поверхности материала до и после обработки антимикробными веществами.

При сравнении изменения тепловыделения клеток в водной среде и на поверхности силикатного материала установлено, что биоцидная активность веществ в иммобилизованном состоянии снижалась в 5–7 раз по сравнению с водными растворами антисептиков и характер их действия сменялся с биоцидного на бактериостатический. Полученные данные указывают на изменение

метаболизма иммобилизованных микроорганизмов и повышение их резистентности к антимикробным веществам на поверхности материалов.

Закключение. Таким образом, проведенные исследования показали, что при иммобилизации микроорганизмов на поверхности силикатных материалов их метаболическая активность снижается и возрастает устойчивость клеток к биоцидным веществам. Не погибшие при воздействии антисептиков бактерии способны быстро адаптироваться к новым условиям существования и повышать свою резистентность к антимикробным веществам.

В работе предложен биокалориметрический метод анализа активности и эффективности действия антимикробных веществ как в водной среде, так и на поверхности материалов. Метод позволяет определять численность и состояние микроорганизмов на поверхности силикатных материалов до и после обработки биоцидами в течение 1–2 ч.

Метод биокалориметрии позволяет также анализировать механизм антимикробного действия препаратов и выявлять биоцидный и биостатический эффекты.

Литература

1. Игнатенко, А. В. Методы контроля активности и эффективности антимикробных препаратов / А. В. Игнатенко // Ресурс- 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. 203–206.
2. Луста, К. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / К. А. Луста, Б. А. Фихте. – Пушино: ОНТИ НЦБИ, 1990. – 186 с.
3. Белясова, Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2007. – 160 с.
4. Совершенствование метода биотестирования ксенобиотиков / Н. А. Белясова [и др.] // Материалы, технологии, инструменты. – 2005. – Т. 10, № 4. – С. 90–93.
5. 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.