

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ МАТЕРИАЛОВ И ИЗДЕЛИЙ

Methods of evaluation the resistance of materials to biofouling were picked up and optimized. These methods enable to obtain the quantity information about the degree of antimicrobial activity of manufactured articles with a complex character of a surface. As a test-culture were used two bacterial species: *Pseudomonas fluorescens* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. As a degree of antibacterial activity different parameters were tested: cells viability, suspension turbidity and indicator colour. It was shown that is most correctly to estimate the antimicrobial properties of articles with complex surface character with adsorption tests, where metabolic activity of microorganisms (in this case – the rate of lactic acid production) is the function of a viable cell number on article surface.

Введение. Биообрастания и повреждение различных изделий, вызываемые микроорганизмами, – серьезная проблема, с которой сталкивается человек в самых разных областях своей деятельности. Особенно часто биообрастания возникают в средах, содержащих большое количество органических соединений, и на поверхностях, характеризующихся хорошей адгезионной способностью из-за множества неровностей. Примером таких систем являются, в частности, мембранные фильтры, через которые пропускают многокомпонентные смеси с высоким содержанием органики.

Основное различие между загрязнением мембранных фильтров коллоидными или кристаллическими осадками и биологическим загрязнением состоит в том, что микроорганизмы не только осаждаются на поверхности мембраны, но и размножаются там, формируя органический матрикс [1]. Его состав на 30–50% состоит из гуминовых веществ, а остальная часть представлена бактериями, водорослями и простейшими (чаще всего в составе биопленок встречаются бактерии родов *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, а также грибы родов *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus*) [2].

Понятно, что биообрастания значительно сокращают срок службы материалов и изделий за счет биокоррозии, обусловленной ферментативными системами микроорганизмов. Кроме того, достигшие определенной массы и величины агрегаты клеток вместе со слизистым матриксом часто отрываются от поверхности материала и попадают в поток, нарушая режим фильтрации.

Решить проблему биообрастаний и предотвратить биокоррозию часто удается путем введения в состав материалов биоцидных веществ или при использовании защитных покрытий с антимикробными свойствами. Расширение спектра биостойких материалов и сфер их использования диктует необходимость адекватной оценки антимикробной активности. Однако на сегодняшний день не существует простого и надежного метода для определения способно-

сти изделий и материалов противостоять микробной колонизации и деструкции.

Целью данного исследования являлась разработка и совершенствование методологии определения антимикробных свойств различных объектов, содержащих в составе биоцидные добавки.

Объекты и методы исследований. В качестве модельных образцов использовали мембранные фильтры на основе полимерных полволоконных элементов, разработанные в ГНУ «Институт физико-органической химии» Национальной академии наук Беларуси. Эти фильтры применяются для очистки жидкостей и газов в биотехнологии, пищевой, фармацевтической, химической, металлургической и других отраслях промышленности. Волокна исследуемых фильтров имеют достаточно развитую поверхность (рис. 1), на которой легко адсорбируются и закрепляются клетки микроорганизмов.

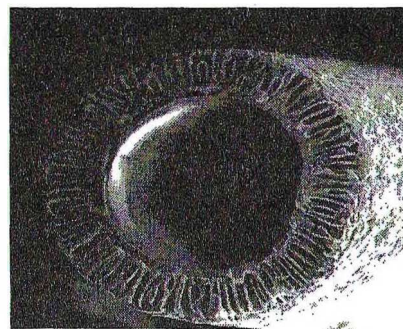


Рис. 1. Поперечный срез полового волокна

При фильтрации водопроводной воды, концентрировании органических растворов и другой обработке жидкостей, содержащих органические вещества, внутри мембранных модулей часто возникают слизистые биообрастания (рис. 2), имеющие в своем составе как бактериальные клетки, так и мицелиальные грибы.

Для борьбы с биообрастаниями в состав формовочных растворов при изготовлении волокон были введены производные полигексаметиленгуанидинов, характеризующиеся выжженными микробиоцидными свойствами [3].

Полученные экспериментальные образцы волокон (ПГ₁, ПГ₂), а также контрольный образец (К), не содержащий биоцидных добавок, тестировали с помощью нескольких методов в попытках определить количественные характеристики их антимикробной активности.

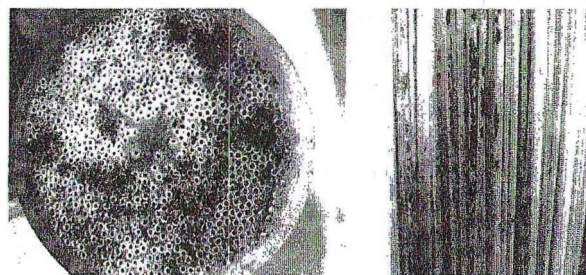


Рис. 2. Примеры биообрастаний мембранных фильтров (темные зоны на белой поверхности волокна)

В качестве тест-культуры использовали широко распространенные в окружающей среде и встречающиеся в составе биообрастаний пигментированные бактерии *Pseudomonas fluorescens*. Бактерии пересевали и культивировали общепринятыми способами.

В работе использовали питательный бульон и 1,5%-ный питательный агар. Подсчет числа жизнеспособных клеток в суспензиях осуществляли методом посева на питательный агар серийно разведенных в физиологическом растворе (0,85% NaCl) суспензий с последующим подсчетом числа колоний. Учитывали по три параллельных посева, усредняя полученные данные.

Результаты и их обсуждение. Самым простым способом определения антимикробных свойств материалов является суспензионный метод (рис. 3).

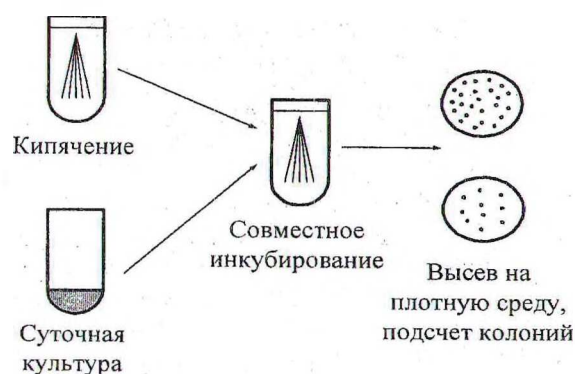


Рис. 3. Схема суспензионного метода

Разведенную до 10^4 КОЕ/мл суточную культуру бактерий вносят в физиологический раствор, в котором предварительно кипятят образец волокна в течение 30 мин (процедура, обеспечивающая вымывание биоцида из волокна в раствор). Инкубируют полученные

суспензии при 30°C в течение 24 ч, после чего высевают на питательный агар для определения концентрации жизнеспособных клеток. Количественную оценку антимикробных свойств образцов в этом методе дает такой параметр, как выживаемость клеток (В), который характеризует эффективность гибели клеток в процессе инкубирования в присутствии антимикробного вещества или содержащего его материала:

$$B = \frac{K_1}{K_0} 100\%,$$

где K_0 — исходная концентрация клеток; K_1 — концентрация клеток после инкубирования с образцом, содержащим биоцид.

В табл. 1 приведены результаты определения выживаемости и ингибирования роста бактерий *P. fluorescens* в суспензионных тестах.

Таблица 1
Антимикробные свойства образцов волокон (суспензионный метод)

Образец	Концентрация жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	Выживаемость, %
ПГ ₁	$1,2 \cdot 10^3$	1,6
ПГ ₂	$4,1 \cdot 10^2$	0,6
К	$7,4 \cdot 10^4$	100

Полученные результаты позволяют судить о достаточно высокой антимикробной активности экспериментальных образцов: в присутствии лучшего из них выживаемость бактерий *P. fluorescens* снизилась на два порядка.

Данный метод дает возможность различить материалы с биоцидными добавками по степени выраженности их антимикробных свойств, однако он имеет существенный недостаток: в нем оцениваются антимикробные свойства только тех веществ, которые выщелачиваются из образца в раствор. Таким образом, материалы, прочно удерживающие биоциды, могут показать в этом методе низкую антимикробную активность, несмотря на то что их поверхность может оставаться защищенной от колонизации микроорганизмами.

В попытках определить, насколько поверхность экспериментальных образцов волокна подвержена колонизации бактериями, использовали адсорбционный метод (рис. 4).

Образцы волокна одинаковой массы помещали в пробирки с суспензией *P. fluorescens*, инкубировали в течение 15–30 мин, позволив клеткам адсорбироваться на волокне, после чего дважды отмывали в физиологическом растворе от неприкрепившихся клеток. Затем волокна с адсорбированными на них бактериями подвергли окраске генциановым фиолетовым в течение 40 мин.

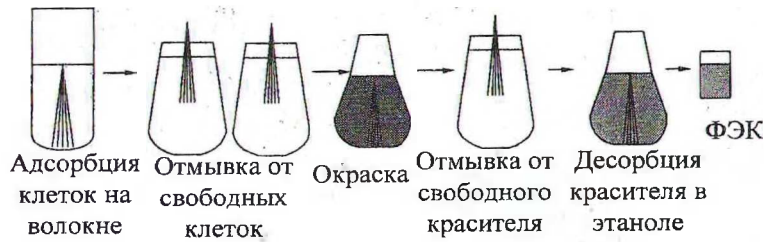


Рис. 4. Схема адсорбционного метода

Этот краситель катионного типа хорошо связывается с отрицательно заряженной поверхностью бактериальных клеток. Не связавшийся с клеточной поверхностью (свободный) краситель смывали с волокна в физиологическом растворе, после чего опускали окрашенные фильтры в этиловый спирт на несколько минут. Определяли оптическую плотность спиртового раствора красителя, смытого с клеточной поверхности. Предполагали, что количество связанного с клетками красителя пропорционально количеству адсорбированных на волокне клеток.

В табл. 2 приведены результаты подобного эксперимента с контрольным (не содержащим биоцид) образцом волокна.

Таблица 2

Параметры колонизации образца волокна (К) бактериями *P. fluorescens*

Условия эксперимента	Длительность адсорбции клеток на волокне, мин	D_{592} спиртового раствора красителя, x_{cp} (3)	Концентрация не прикрепившихся к волокну клеток, КОЕ/мл
Волокно в клеточной суспензии	0	0,40	$1,8 \cdot 10^8$
	15	0,42	$6,2 \cdot 10^7$
	30	0,44	$4,7 \cdot 10^7$
Волокно в воде	—	0,46	—

Приведенные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что количество свободно суспендированных клеток с увеличением времени адсорбции существенно уменьшается, что объясняется их прикреплением к волокну. А вот интенсивность окраски раствора генцианового фиолетового практически не изменяется. Более того, оптическая плотность спиртового раствора красителя, смытого с самого волокна, даже немного выше, чем красителя, смытого с поверхности клеток. Объяснением этому может служить лишь то, что генциановый фиолетовый эффективно связывается с поверхностью полимерного волокна. Поиск красителя, который бы отличался селективностью связывания с бакте-

риальной клеточной стенкой, не увенчался успехом: все 18 испытанных красителей одинаково хорошо связывались с поверхностью волокна и с клеточной поверхностью.

Выявленная в данном эксперименте закономерность снижения концентрации свободно суспендированных бактерий при увеличении длительности адсорбции клеток на волокне послужила основанием для модификации адсорбционного метода.

В модифицированном методе критерием оценки интенсивности биообрастания служило не количество красителя, связанного с поверхностью адсорбированных на волокне клеток, а способность этих клеток размножаться, обеспечивая увеличение мутности суспензий. Схема метода представлена на рис. 5.

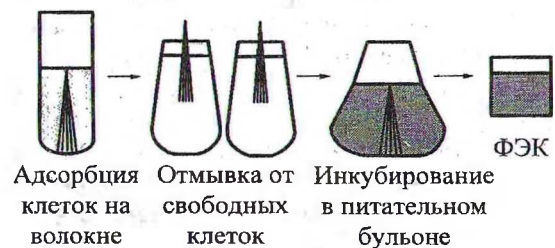
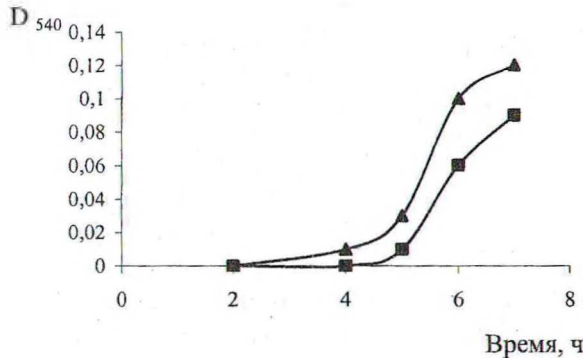


Рис. 5. Схема модифицированного адсорбционного метода

Суть метода заключается в том, что волокно с адсорбированными на нем бактериями *P. fluorescens* отмывали дважды от непрочно прикрепившихся клеток, а затем помещали в питательную среду и инкубировали в условиях, обеспечивающих интенсивное деление клеток выбранной тест-культуры, периодически определяя степень мутности суспензии. При этом полагали, что чем большее число бактерий из состава адсорбированных на волокне сохранило жизнеспособность, тем быстрее будет увеличиваться концентрация свободно суспендированных клеток, образующихся в процессе размножения, и тем раньше будет достигнута максимальная мутность суспензии. Временной интервал между достижением определенной степени мутности с контрольным и опытным образцами волокна мог бы служить числовой

характеристикой, отражающей различие в антимикробных свойствах материалов.

На рис. 6 приведены результаты подобного эксперимента.



▲ – изменение мутности суспензии *P. fluorescens* с образцом волокна К;
■ – изменение мутности суспензии *P. fluorescens* с образцом волокна ПГ₂

Рис. 6. Изменение во времени мутности бактериальных суспензий в модифицированном адсорбционном методе

Как видно из рис. 6, степень мутности суспензии, в которой находилось волокно без биоцида, изменялась быстрее, чем степень мутности суспензии с контрольным образцом волокна. Это является отражением того, что исходная концентрация жизнеспособных клеток, колонизировавших контрольный образец, была выше, чем концентрация бактерий на образце волокна с биоцидом. Таким образом, выявленные различия в степени мутности бактериальной суспензии могут отражать степень защищенности материала от биообрастания. В то же время различия в полученных показателях оптической плотности не столь существенны, как ожидалось, исходя из данных суспензионного метода. Это можно объяснить тем, что мутность суспензий формируется за счет увеличения численности свободно суспендированных клеток, которые являются потомками адсорбированных на волокне бактерий, но уже не связаны с поверхностью волокна и не испытывают на себе антимикробного действия входящих в состав волокна биоцидных веществ.

Изменить ситуацию, получив возможность определить состояние только колонизирующих волокно клеток, можно следующим образом: создать для адсорбированных на волокне бактерий условия, в которых бы они не делились,

но сохраняли метаболическую активность и продуцировали биологически активные вещества, для которых доступен несложный количественный анализ.

В одном из таких экспериментов в качестве тест-культуры использовали молочнокислые бактерии *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, которые реализуют единственный способ метаболизма – молочнокислое брожение, сопровождающееся накоплением большого количества лактата и быстрым подкислением среды.

В пробирки с 5 мл стерильного обезжиренного молока вносили равные по массе образцы волокна (ПГ₁, ПГ₂ и К) с адсорбированными клетками и индикатор – метиленовый синий. Периодически контролировали изменение цвета индикатора при инкубировании в подходящих условиях. При этом изменение окраски индикатора в молоке, где находился контрольный образец волокна, происходило на 35 мин раньше, чем в молоке с образцом ПГ₁, и на 45 мин раньше, чем в молоке с образцом ПГ₂. Это может являться отражением того, что количество жизнеспособных и метаболически активных бактерий на поверхности контрольного волокна было самым большим, а на поверхности образца ПГ₂ – самым меньшим, что, в свою очередь, характеризует антимикробные свойства волокон.

Вывод. Разработанные и оптимизированные методы дают возможность количественно оценивать степень антимикробной активности материалов, прочно удерживающих биоцидные добавки, а также изделий сложного профиля и с разным характером поверхности.

Литература

1. Biofouling – the Achilles heel of membrane processes / H. Flemming [et al.] // *Desalination*. – 1997. – V. 113. – P. 215–225.
2. Baker, J. S. Biofouling in membrane systems – A review / J. S. Baker, L. Y. Dudley // *Desalination*. – 1998. – V. 118. – P. 81–90.
3. Характеристика биоразлагаемых производных полигексаметиленгуанидинов с антимикробной активностью / Л. И Антоновская [и др.] // *Современные проблемы технического, естественнонаучного и гуманитарного знания: сб. докладов всерос. науч.-практ. конф., Губкин, 25–26 янв. 2007 г.: в 2 ч. / Губкинский филиал БГТУ им. В. Г. Шухова, 2007. – Ч. 1. – С. 59–62.*