

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ ПРИ СКРИНИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

METHOD FOR EVALUATING THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF FIBROUS MATERIALS IN SCREENING STUDIES

О.Ю.КУЗНЕЦОВ, Т.А. ШУТОВА, А.В. СТАРШОВА, И.А.НАВАРРСКАЯ, М.Г. ГОЛОВЛЕВ
O.YU. KUZNETSOV, T.A. SHUTOVA, A.V. STARSHOVA, I.A. NAVARRSKAYA, M.G.GOLOVLYEV

(Ивановская государственная медицинская академия,
ООО "Кашинский Льнокомбинат")

(Ivanovo State Medical Academy,
LLC "Kashinsky Flax Factory")

E-mail: olegkuz58@ya.ru

В статье представлены теоретические и экспериментальные данные о возможности быстрого определения антимикробного действия волокнистых материалов при получении новых модификаций с целью улучшения и сохранения оптимальных свойств. В работе была использована оригинальная нефелометрическая методика определения реакции популяции микроорганизмов после их прямого контакта с исследуемыми образцами различных волокнистых материалов. Были использованы различные тест-культуры микроорганизмов: Escherichia coli, Staphylococcus aureus и грибы рода Candida (C. albicans). Полученные результаты оценены по воспроизводимости, что показало возможность применения разработанной методики для проведения скрининговых исследований по определению антимикробного воздействия без больших трудозатрат, которые сопровождают подобные микробиологические исследования.

The article presents theoretical and experimental data on the possibility of rapid determination of the antimicrobial action of fibrous materials during the preparation of new modifications in order to improve and maintain optimal properties. In this paper, a new nephelometric method was used to determine the reaction of a population of microorganisms after their direct contact with the samples of various fibrous materials under study. Different test cultures of microorganisms were used: Escherichia coli, Staphylococcus aureus and fungi of the genus Candida (C. albicans). The results obtained were evaluated for reproducibility, which showed the

possibility of using the developed technique for screening studies to determine antimicrobial effects without the large labor costs that accompany such microbiological studies.

Ключевые слова: микроорганизмы, антимикробное действие, волокнистые материалы.

Keywords: microorganisms, antimicrobial action, fibrous materials.

Цель исследования состояла в разработке методики по оценке антимикробной активности волокнистых материалов, которые возможно применить для проведения большого количества экспериментов сравнения в скрининговых исследованиях [1], [2] по созданию модификаций волокнистых материалов текстильного производства. В настоящей работе были поставлены следующие задачи – разработка и унификация методики выполнения оценки антимикробного воздействия, апробация данной методики, определение воспроизводимости получаемых данных в независимых экспериментах.

В качестве тест-культур микроорганизмов использовали следующие микробные культуры: *Escherichia coli* штамм M-17, *Staphylococcus aureus* 6538-P ATCC=209-P FDA и дрожжеподобные микроскопические грибы *Candida albicans* CCM 8261 (ATCC 90028). Для культивирования микроорганизмов была использована жидкая питательная среда – мясо-пептонный бульон (МПБ). В экспериментах по оценке эффекторного воздействия на микроорганизмы в каждую пробирку с 9 мл МПБ вносили навеску волокнистого материала - 0,25 г. Посев тест-культур выполняли в объеме 10 мкл на экспериментальную пробирку. Все посевы помещали в термостат на 24 ч при температуре 37° С. После этого проводили нефелометрические замеры оптической проницаемости (зеленый светофильтр - 540 нм, кювета объемом 3 мл), данные которой потом были пересчитаны в оптическую плотность. Статистические расчеты были выполнены в таблицах Excel, что позволяет получить ответ по оценке антимикробного действия конкретного образца волокнистого материала при развитии определенной тест-культуры микроорганизмов.

Текстильные материалы могут оказывать воздействие на жизнеспособность микроорганизмов. Это обычно выполняют либо путем нанесения микробов и их последующей экспозиции с последующей их отмывкой с данного носителя и высева на питательные среды, либо расположения тестируемых образцов материалов на посевах микробных культур, выполненные по методу "газона". При этом надо учитывать, что довольно сложно исследовать антимикробную активность волокнистых материалов, поскольку они представлены отдельными переплетенными нитями, формирующими исследуемый образец. Эти образцы трудно распределить на агаризованной поверхности питательной среды для контакта с засеянной тест-культурой микроорганизмов, чтобы затем метрологически достоверно и правильно оценить результаты физиологической реакции микробов. Данный метод не позволяет определить наличие стимуляции роста микробной культуры. Для выполнения большого количества экспериментов по оценке антимикробного воздействия волокнистых материалов нами был разработан и апробирован новый метод оценки антимикробного действия (АМД) волокнистых материалов (ВМ) с использованием нефелометрического метода определения для скрининговых исследований.

Предлагается использовать для оценки эффективности установление коэффициента пропускания раствора с последующим расчетом оптической плотности (ОП) и сравнением результатов относительно контролей роста тест-культуры без присутствия образца различных ВМ. Общий расчет по предложенному методу представлен на рис. 1. Точное представление точек относительно друг друга условно.

На рис. 1: А – коэффициент пропускания образца – контроль роста микробной культуры без внесения любых других компонентов (контроль); В – коэффициент пропускания образца – контроль питательной среды (чистая среда без внесения в нее тестируемого объекта); С – коэффициент пропускания образца – контроль питательной среды с внесенным в нее тестируемым образцом; D – коэффициент пропускания образца – рост культуры микробов в присутствии тестируемого образца волокнистого материала.

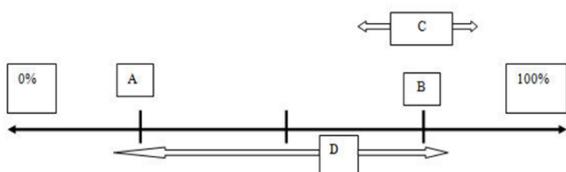


Рис. 1

Расчет антимикробного воздействия проводится с учетом следующих моментов.

I. При рассмотрении возможных вариантов присутствия тестируемого образца в питательной среде без присутствия микроорганизмов в среде культивирования возможны следующие варианты.

1. В случае, если $B=C$, то из объекта не происходит никакого выхода веществ в питательную среду.

2. В случае, если $B>C$, то происходит адсорбция веществ среды тестируемым образцом волокнистого материала.

Таким образом есть возможность доказать, что в случае (1-2), где $B \geq C$, регистрируется адсорбция среды тестируемым образцом волокнистого материала.

3. В случае, если $C < B$, то происходит ресорбция веществ из тестируемого образца волокнистого материала и увеличивается мутность среды.

Оптимально оценивать действие образца волокнистого материала, когда не происходит значительной ресорбции веществ из объекта.

II. При наличии в питательной среде тестируемого образца волокнистого мате-

риала и микробной культуры точка D может находиться как слева от точки A ($D < A$), так и справа ($D > A$):

В данном случае: 1. Если $D < A$, то происходит рост микробной культуры

2. Если $D > A$, то ингибирование микробной культуры.

При использовании такого подхода в изучении АМД тестируемого образца ВМ возможно количественно определить степень воздействия на микробную культуру образца в процентах, что позволяет сравнивать полученные модификации образцов волокнистого материала между собой по АМД и быстро выполнить скрининговые исследования по эффекторному действию ВМ на микробы.

Для подтверждения возможности использования разработанной методики оценки антимикробного действия были выполнены эксперименты по ее апробации и оценке воспроизводимости.

Полученные данные представлены в табл. 1. Воспроизводимость методики оценивали по коэффициенту вариации (CV) данных измерений оптической плотности для микробных культур, поскольку известно, что если CV для выборки менее 33%, то совокупность чисел в ней – однородная. В целом установлено, что во всех экспериментах с использованием данной методики CV не превышает значений в 7%, что свидетельствует о высокой однородности (воспроизводимости) полученных данных.

Полученные данные по оптической плотности свидетельствуют, что использованные в эксперименте волокна оказывают АМД на тест культуры микроорганизмов различное воздействие. Культура *E.coli* ингибируется примерно одинаково (льняное волокно – 14%, пеньковое – 15%). Культура *S.aureus* ингибируется в большей степени при использовании волокна льняного (52%), чем волокна пенькового (1%). АМД ВМ также ингибирует культуру *C.albicans* (льняное волокно -15% и пеньковое волокно - 22%).

Образец (n=10)	Культура микроорганизмов					
	E.coli		S.aureus		C.albicans	
	Оптическая плотность D M±m	CV, %	Оптическая плотность D M±m	CV, %	Оптическая плотность D M±m	CV, %
Волокно льняное	0,155±0,002 σ = 0,007	4,56	0,118±0,001 σ = 0,004	3,1	0,184±0,002 σ = 0,006	3,4
АМД	-14%		-52		-15	
Волокно пеньковое	0,153±0,002 σ = 0,01	6,79	0,213±0,001 σ = 0,003	1,4	0,175±0,001 σ = 0,003	1,9
АМД	-15%		-1		-22	
Контроль среды	0,0271±0,0002 (M±m) σ = 0,001 CV% = 3					
Контроль роста культуры	0,181±0,003 σ = 0,008	1,9	0,215±0,001 σ = 0,004	0,8	0,214±0,002 σ = 0,004	1,3

Полученные данные позволяют определить наиболее эффективный ВМ в отношении определенной микробной культуры. Так, например, в наших экспериментах культуру золотистого стафилококка ингибируют волокна льняного материала, в то время как при использовании волокна пенькового ингибирующего воздействия в отношении данной микробной культуры практически не регистрируется. Наблюдается ингибирование развития бактерий *E.coli* (14-15%) и дрожжеподобных грибов рода *Candida* (15% для льняного волокна и 22% для пенькового волокна), причем регистрируется существенная разница в антимикробном воздействии различных ВМ.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных возможно определить не только антимикробную активность конкретных образцов ВМ в отношении определенных тест-культур микроорганизмов, но также оценить степень данного воздействия ВМ на тест-культуры различных микроорганизмов, что особенно важно при большом количестве испытуемых образцов ВМ.

ВЫВОДЫ

1. Теоретически обоснована методика оценки АМД ВМ при проведении скрининговых исследований при использовании различных микробных тест-культур.

2. При помощи предложенной методики установлено наличие различного АМД волокна льняного и пенькового, что дает возможность выбрать наиболее перспективный материал для его дальнейшего улучшения и последующего использования в производстве текстильных материалов.

3. Использование предложенной нами методики позволяет проводить скрининговые исследования при большом количестве экспериментальных образцов по оценке АМД ВМ с достаточной воспроизводимостью получаемых данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 32379–2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной токсичности (скрининговый метод).

2. Лиманский Е.С., Погорелова Е.С. Инструментальные методы скрининга биологической активности // Молодой ученый. – 2015, №11. С.497...499.

REFERENCES

1. GOST 32379–2013. Metody ispytaniya po vozdeystviyu khimicheskoy produktsii na organizm cheloveka. Ispytaniya po otsenke reproduktivnoy toksichnosti (skringovyy metod).

2. Limanskiy E.S., Pogorelova E.S. Instrumental'nye metody skringa biologicheskoy aktivnosti // Molodoy uchenyy. – 2015, №11. S.497...499.

Рекомендована кафедрой микробиологии и вирусологии ИГМА. Поступила 17.03.21.