

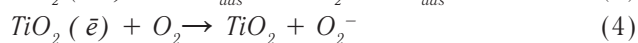
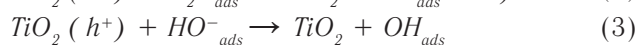
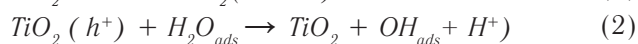
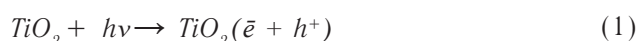
УДК 615.468.21:546.82

КОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ БАКТЕРИЦИДНОСТИ НА ПОВЕРХНОСТИ ПЛЕНОК ДИОКСИДА ТИТАНА

© 2013 г. С. Н. Плескова, И. С. Голубева, *Ю. К. Веревкин

Нижегородский государственный технический университет
им. Р. Е. Алексеева,*Институт прикладной физики Российской академии наук, г. Нижний
Новгород

Одна из ведущих проблем медицинской экологии — контаминация лечебных учреждений антибиотико-резистентными штаммами, приводящая к возникновению нозокомиальных инфекций [5]. Важным резервуаром для патогенных и условно-патогенных бактерий являются поверхности медицинских учреждений [9]. Самоочищающиеся покрытия не только снижают значимость поверхностей в качестве резервуара инфекции, но и способствуют очистке воздуха медицинских учреждений. В качестве тонкопленочных покрытий с самостерилизующимися свойствами используются полупроводники, среди которых чаще всего применяется диоксид титана (TiO_2) благодаря его относительно низкой стоимости, стабильности и высокой активности [15]. При внесении дополнительной энергии (чаще всего кванта ультрафиолета), превышающей ширину запрещенной зоны (3,2 эВ для кристаллической модификации — анатаза) происходит возбуждение электрона (\bar{e}) и его переход из валентной зоны в зону проводимости, где он акцептируется кислородом. В результате в валентной зоне формируется электронная вакансия — дырка (h^+), которая также принимает участие в формировании активных форм кислорода (АФК) [7]. В целом активация поверхности ультрафиолетом, сопровождающаяся образованием АФК, может быть описана следующим комплексом реакций:



Образующиеся на поверхности TiO_2 -пленок АФК окисляют мембрану адсорбированных микроорганизмов, что приводит к бактериолизу [11]. Среди механизмов бактерицидности фотоиндуцированных пленок TiO_2 отмечены также: окисление бактериальных ферментов [14], перекисное окисление как мембранных, так и не мембранных ненасыщенных жирных кислот [8], снижение pH [16], окисление нуклеотида и плазмидной ДНК, а также РНК бактериальных клеток [18].

Проблемой практического использования тонкопленочных покрытий является возможность гидрофилизации TiO_2 -пленок после однократного использования, что сопровождается снижением бактериолиза на поверхности [4]. Поэтому целью данной работы являлось изучение условий, влияющих на эффективность бактерицидной активности TiO_2 -пленок. Для этого решались следующие задачи: 1) исследование динамики бактерицидной активности пленок в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий; 2) кондиционирование абиотической системы — сравнение влияния физических и химических

Для профилактики нозокомиальных инфекций разрабатываются специальные покрытия на основе диоксида титана (TiO_2). При их облучении ультрафиолетом (УФ) на поверхности генерируются активные формы кислорода, вызывающие гибель бактерий. В работе исследовано влияние на бактерицидную активность TiO_2 -пленок времени облучения УФ, термической и химической обработки пленок, изучена бактерицидность в отношении клинических штаммов суспендированных и лиофилизированных бактерий. Жизнеспособность суспендированных бактерий определялась методом подсчета КОЕ, лиофилизированных — методом оценки бактерицидности на основании коэффициентов экстинкции контрольных и опытных проб. Показано, что бактерицидный эффект тонких пленок в отношении всех штаммов повышается при увеличении экспозиции в потоке УФ; термическая и химическая обработка вызывает восстановление бактерицидности, которая утрачивается при первичной инкубации бактериальной суспензии на поверхности; отсутствие жидкости в системе увеличивает бактерицидную активность TiO_2 -пленок.

Ключевые слова: бактерицидность, пленки диоксида титана

способов обработки TiO_2 -пленок на эффективность реализации бактерицидности; 3) кондиционирование биотической системы — выявление бактерицидности TiO_2 -пленок в отношении лиофилизированных штаммов бактерий.

Методы

В качестве объектов исследования использовали бактериальные штаммы: золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus* 956), эпидермального стафилококка (*S. epidermidis* 1061), кишечной палочки (*Escherichia coli* 321-5), выделенные на базе бактериологической лаборатории клинической инфекционной больницы № 2 г. Нижнего Новгорода.

Получение TiO_2 -пленок. TiO_2 -пленки формировали на поверхности стекла методом золь-гель технологии. В качестве прекурсора использовали 5 % тетрабутоксититан $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ в изопропиловом спирте ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), степень чистоты 99,5 %. В качестве катализаторов реакций гидролиза и поликонденсации применяли соляную кислоту (37 % HCl) и толуол (99,5 % $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$). Раствор наносили на вращающуюся чашку Петри (400 об/мин) и с помощью центробежной силы распределяли по поверхности стекла до появления однородного прозрачного слоя полимеризованной титановой кислоты. Последующая экспозиция (24 °C, 30 мин) приводила к повышению вязкости и формированию геля. Дальнейшая термическая обработка (450 °C, 5 ч) завершала реакции разложения промежуточных продуктов гидролиза. В итоге формировалась прозрачная пленка TiO_2 , прочно связанная с поверхностью стекла [6].

Работа с бактериальной суспензией. Штаммы выращивали на ГМФ-агаре (ЗАО «НИЦ фармакотерапии», Санкт-Петербург) 20 ч при 37 °C. Со скошенного агара делали смыв стерильным физиологическим раствором (ФР, pH 7,2, ОАО «Биохимик», г. Саранск), дважды отмывали центрифугированием (200 г, 20 мин) и доводили коэффициент экстинкции микробной суспензии до 0,269 на КФК-2МП (Россия) (670 нм), что соответствовало 10 МЕ стандарта мутности. Из полученной суспензии готовили серию разведений, для того чтобы добиться формирования на ГМФ-агаре изолированных колоний в количестве около 200 КОЕ. Все разведения готовили на стерильном ФР, поскольку существуют данные о неоднозначном влиянии фосфатно-солевого буфера на бактерицидную активность TiO_2 -пленок [12].

Леофилизация бактерий. Суспензию бактерий ($2,2 \cdot 10^8$ микроорганизм/мл) заливали во флаконы, помещали в кассеты и замораживали (–40 °C, 12 ч). Замороженный материал быстро переносили в сублиматор, создавали глубокий вакуум (0,1 мм рт. ст.) и пониженную температуру (–50 °C). Для удаления связанной воды из бактериальной массы производили досушивание материала в этой же камере при 36 °C. После окончания леофильной сушки вакуумный насос выключали и в камеру через фильтр подавали азот. После этого флаконы с образцами укупоривали.

Исследование бактерицидной активности TiO_2 -пленок. Нижеизложенный протокол использовали для исследования бактерицидной активности в отношении бактериальных суспензий. Нанесенную на TiO_2 -пленки бактериальную суспензию облучали УФ-светом (365 нм) в течение 15, 30 или 60 мин. Плотность мощности светопотока УФ-лампы (ВНО-2, Украина), оцененная измерителем энергии излучения (ИМО-2Н, Россия), составила 4,5 мВт/см². Для отсеечения «жесткого» ультрафиолета, обладающего собственной бактерицидной активностью ($\lambda < 340$ нм), использовали светофильтр УФС-6. В контрольном эксперименте в тех же условиях облучали бактериальную суспензию, нанесенную на поверхность стерильного стекла. Снижение жизнеспособности бактерий на TiO_2 -пленках оценивали относительно этого контроля. В серии предварительных экспериментов бактериальную суспензию инкубировали как на поверхности TiO_2 -пленок, так и без нее (поверхность стекла), в темноте. Поскольку наблюдали отсутствие различий в количестве КОЕ у бактерий, инкубированных на поверхности TiO_2 -пленок и на поверхности стекла в серии темновых экспериментов, в дальнейшем этот контроль был исключен. После инкубации под УФ-светом бактериальную суспензию (0,05 мл) стерильно переносили на поверхность ГМФ-агара и равномерно распределяли по поверхности чашки Петри. Посевы инкубировали 20 ч при 37 °C, после чего подсчитывали КОЕ.

Физические и химические способы обработки поверхности TiO_2 -пленок. После исследования чашки Петри с нанесенными на них TiO_2 -пленками помещали в рабочий раствор жавеля («Jasol», Франция), затем промывали дистиллированной водой и стерилизовали в сухожаровом шкафу (180 °C, 60 мин). После выявления факта гидрофилизации поверхности и снижения бактерицидной активности тонких пленок [4] для реверсии первичных свойств TiO_2 -пленок использовали физический метод — отжиг в муфельной печи (450 °C, 3 ч) или химический метод — обработка бензолом (ЧДА, 99,6 %, 1 мл, 24 ч). Аналогичным манипуляциям подвергалась поверхность стекла, используемая в контрольных экспериментах. Далее бактерицидная активность обработанных пленок была исследована согласно основному протоколу.

Статистическая обработка данных. Сравнение дисперсий средних значений контроля (только ультрафиолет) и опыта (ультрафиолет + TiO_2 -пленки) проводили с использованием критерия Стьюдента для парных выборок [2. С. 286–294]. Статистически значимыми различия между двумя выборками признавали при $p < 0,05$. Предварительно проводилось определение границ нормального распределения количественных показателей с использованием критерия Шапиро — Уилка для малых выборок [3. С. 54]. Для статистического анализа использована программа Origin Pro 8.

Результаты

Исследование динамики биоцидности тонких пленок диоксида титана выявило существенное снижение жизнеспособности грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий (табл. 1). Увеличение времени инкубации приводит к уменьшению числа колониеобразующих единиц (КОЕ). Для двух штаммов — *S. epidermidis* 1061 и *E. coli* 321-5 характерны практически одинаковые результаты жизнеспособности для 15 и 30 мин экспозиции, и только увеличение времени экспозиции под УФ до 60 мин вызывает значительное изменение бактерицидного эффекта TiO_2 -пленок. В то же время для *S. aureus* 956 отмечается постоянное снижение жизнеспособности при увеличении времени инкубации.

Однако поток УФ в присутствии жидкости на поверхности TiO_2 -пленок вызывает их гидрофилизацию. В результате бактерицидный эффект практически полностью исчезает [4]. Были предприняты попытки реверсии первоначальных свойств TiO_2 -пленок с помощью физических и химических факторов. После первичной инкубации под УФ-светом с бактериальной суспензией поверхности повторно отжигались в муфельной печи (450 °C, 3 ч) и тестировались в системе с бактериями.

Для исследования брали *S. aureus* 956 и *E. coli* 321-5. Результаты представлены в табл. 2. Отжиг вызывает реверсию свойств TiO_2 -пленок: их бактерицидная активность восстанавливается в полном объеме.

Опробован химический метод обработки гидрофилизированных поверхностей. Для этого использованные TiO_2 -пленки инкубировали с бензолом: чашки Петри (Ø 40 мм) (контроль) и чашки Петри с нанесенными на них TiO_2 -пленками заливали 1 мл бензола и экспонировали в вытяжном шкафу в течение 24 часов. За время экспозиции бензол полностью испарялся, после чего на обработанных поверхностях исследовали динамику бактерицидной активности в отношении штамма *S. epidermidis* 1061. Результаты суммированы в табл. 3. Они доказывают, что обработка бензолом, как и термическое воздействие, вызывает полную реверсию бактерицидных свойств TiO_2 -пленок.

Однако для сохранения гидрофобных свойств поверхностей после обработки бензолом не проводилась отмывка (поскольку внесение воды вновь могло вызвать гидрофилизацию). Для исключения предположения об увеличении бактерицидной активности пленок в результате воздействия

Таблица 1

Динамика снижения жизнеспособности бактериальных штаммов (КОЕ) на поверхности TiO_2 -пленок

Штамм		Время инкубации, мин		
		15	30	60
<i>S. aureus</i> 956	Контроль	103,5 ± 9,9	68,3 ± 9,7	18,5 ± 5,1
	Опыт	72,2 ± 8,6 (t=12,2; df=10; p<0,001)	34,1 ± 7,5 (t=7,4; df=7; p<0,001)	7,5 ± 3,5 (t=5,3; df=7; p=0,001)
<i>S. epidermidis</i> 1061	Контроль	106,0 ± 12,2	106,1 ± 19,8	103,7 ± 19,4
	Опыт	81,3 ± 11,3 (t=6,7; df=10; p<0,001)	83,3 ± 20,8 (t=5,7; df=10; p<0,001)	56,2 ± 19,8 (t=9,5; df=17; p<0,001)
<i>E. coli</i> 321-5	Контроль	106,0 ± 12,2	102,8 ± 12,9	94,5 ± 18,4
	Опыт	81,3 ± 11,3 (t=6,7; df=10; p<0,001)	82,3 ± 16,5 (t=4,9; df=9; p<0,001)	57,7 ± 19,7 (t=10,1; df=14; p<0,001)

Таблица 2

Динамика снижения жизнеспособности бактериальных штаммов (КОЕ) на поверхности термически обработанных (450 °C, 3 ч) TiO_2 -пленок

Штамм		Время инкубации, мин		
		15	30	60
<i>S. aureus</i> 956	Контроль	136,4 ± 40,7	127,4 ± 9,2	91,1 ± 9,6
	Опыт	98,9 ± 26,5 (t=4,6; df=9; p=0,001)	42,1 ± 4,5 (t=20,1; df=7; p<0,001)	3,1 ± 1,4 (t=23,9; df=7; p<0,001)
<i>E. coli</i> 321-5	Контроль	108,6 ± 33,4	111,1 ± 37,2	104,3 ± 25,9
	Опыт	86,4 ± 33,0 (t=2,9; df=7; p=0,020)	69,6 ± 36,2 (t=5,1; df=9; p<0,001)	54,0 ± 15,1 (t=5,6; df=10; p<0,001)

Таблица 3

Динамика снижения жизнеспособности *S. epidermidis* 1061 (КОЕ) на поверхности химически обработанных TiO_2 -пленок (бензол, 24 ч)

Штамм		Время инкубации, мин		
		15	30	60
<i>S. epidermidis</i> 1061	Контроль	70,1 ± 29,9	48,4 ± 25,4	46,5 ± 5,7
	Опыт	26,5 ± 9,3 (t=8,5; df=7; p<0,001)	5,8 ± 1,2 (t=4,8; df=7; p=0,002)	1,0 ± 0,2 (t=14,1; df=7; p<0,001)

на бактерии неиспарившимся, остаточным бензолом было проведено сравнительное исследование жизнеспособности штамма на поверхности необработанного стерильного стекла (контроль) и стерильного стекла, обработанного бензолом в том же режиме, что ранее обрабатывались TiO_2 -пленки (опыт). Результаты, представленные в табл. 4, демонстрируют полное отсутствие влияния на жизнеспособность штамма *S. epidermidis* 1061 предварительной обработки поверхностей бензолом.

В условиях стационаров контаминация воздушной среды и поверхностей может происходить и в виде микрозупензий, и в виде сухих микрозаступиц, содержащих бактерии [10]. Нами была разработана методика исследования жизнеспособности лиофилизированных бактерий на TiO_2 -пленках. Еще одной причиной для создания новой методики было исключение возможности контакта поверхности с жидкостью, чтобы предотвратить эффект гидрофиллизации. В этом случае появляется возможность исследования бактерицидного эффекта пленок многократно без изменения изначальных гидрофобных свойств поверхности. Методика включала следующие этапы:

1. Леофилизированные микроорганизмы ($2,2 \cdot 10^8$ микроорганизм) насыпали на поверхность стекла, экспонированного в стерильных условиях без доступа УФ (контрольный эксперимент); на поверхность стерильного стекла, экспонированного под УФ (опыт 1) и TiO_2 -пленок, экспонированных в потоке УФ (опыт 2). Время экспозиции во всех экспериментах составило 15 мин. В контрольном эксперименте оценивалась жизнеспособность бактериальных штаммов, выведенных из лиофилизированного состояния в условиях окружающей среды. Опыт 1 отражал бактерицидное действие только УФ,

а опыт 2 — сочетанное воздействие двух факторов — УФ и TiO_2 -пленок.

2. Бактерии сухо переносили в мясо-пептонный бульон (МПБ) (ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и инкубировали 37°C , 72 ч (время инкубации было подобрано для обоих штаммов по кривой роста бактериальной культуры в серии предварительных экспериментов — рис. 1).

3. К моменту выхода культуры на стационарную фазу роста количество бактерий в МПБ определяется изначальной концентрацией выживших на поверхностях бактерий — поэтому проводилась спектрофотометрическая оценка коэффициента экстинкции контрольных и опытных проб против стерильного МПБ на КФК-2МП (Россия) (670 нм).

4. Бактерицидность оценивали в процентах по формуле:

$$\text{Бактерицидность} = 100\% - \frac{100 \cdot O_{670}}{K_{670}},$$

где O_{670} — коэффициент экстинкции опытной пробы (опыт 1 или опыт 2), K_{670} — коэффициент экстинкции контрольной пробы.

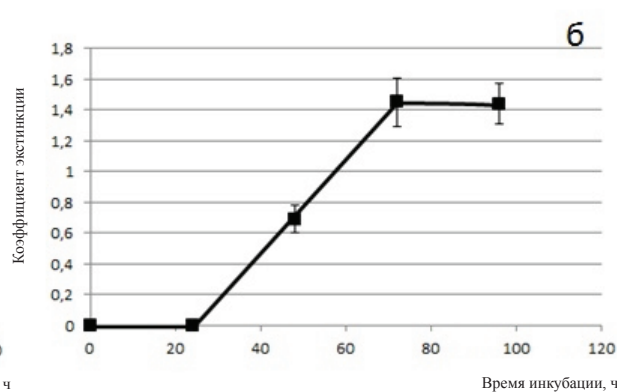
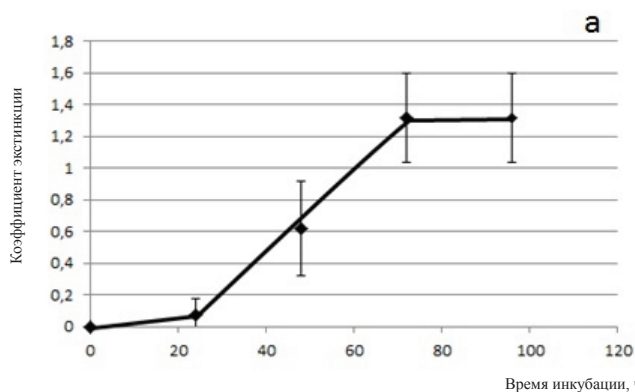
5. После использования стекла и TiO_2 -пленки стерилизовали в стандартном режиме (180°C , 60 мин) и использовали повторно согласно вышеизложенному протоколу.

Результаты бактерицидной активности TiO_2 -пленок в отношении лиофилизированных штаммов *S. aureus* 956 и *E. coli* 321-5 показаны в табл. 5. Проводилось попарно сравнение биоцидного эффекта УФ и сочетанного эффекта УФ и TiO_2 -пленок для каждого штамма отдельно.

Анализ представленных данных позволяет сделать три практически важных заключения. Во-первых,

Таблица 4
Жизнеспособность *S. epidermidis* 1061 (КОЕ) на поверхности стекла (контроль) и стекла, обработанного бензолом (опыт)

Штамм		Время инкубации, мин		
		15	30	60
<i>S. epidermidis</i> 1061	Контроль	$114,7 \pm 13,3$	$97,8 \pm 24,2$	$92,1 \pm 14,2$
	Опыт	$107,3 \pm 22,7$ ($t=1,0$; $df=11$; $p=0,300$)	$106,0 \pm 24,6$ ($t=-1,1$; $df=12$; $p=0,300$)	$96,7 \pm 21,6$ ($t=-0,5$; $df=9$; $p=0,600$)



Кривые роста бактериальной культуры, построенные по сериям из пяти экспериментов для каждого штамма: (а) *S. aureus* 956, (б) *E. coli* 321-5. В обоих случаях выход кривой на стационарную фазу роста наблюдался через 72 часа от начала инкубации

Таблица 5

Бактерицидный эффект (%) ультрафиолета и TiO₂-пленок в отношении лиофилизированных штаммов

Штамм	Биоцидный фактор	Первичный эксперимент	Повторный эксперимент на той же поверхности (стекло/ TiO ₂ -пленка) после стерилизации
<i>S. aureus</i> 956	УФ	79,8 ± 29,3	59,2 ± 38,5
	УФ + TiO ₂	98,9 ± 1,5 (t = -1,56; df=5; p=0,200)	90,5 ± 20,0 (t = -1,8; df=5; p=0,130)
<i>E. coli</i> 321-5	УФ	49,7 ± 44,9	26,8 ± 5,7
	УФ + TiO ₂	77,0 ± 32,0 (t = -2,5; df=7; p=0,040)	76,7 ± 21,2 (t = -4,9; df=5; p=0,040)

повторное использование пленок не приводит к инактивации бактерицидной активности диоксида титана, в случае если условиями эксперимента исключен контакт TiO₂ с жидкостью. Во-вторых, при использовании лиофилизированных бактерий бактерицидный эффект тонких пленок значительно выше, чем в случае воздействия на суспендированную в жидкости форму бактерий. Уже 15 мин экспозиции в потоке УФ на поверхности TiO₂-пленок достаточно для практически полного подавления жизнеспособности *S. aureus* 956 и преодоления 50 % барьера бактерицидности в отношении *E. coli* 321-5. В-третьих, для *E. coli* 321-5 получены статистически значимые различия в биоцидности монофакторного воздействия (только УФ) и сочетанного воздействия двух факторов (УФ + TiO₂). Можно предположить, что АФК, образующиеся на поверхности TiO₂-пленок в результате фотоактивации поверхности, вносят больший вклад в бактерицидный эффект в отношении данного штамма, тогда как для *S. aureus* 956 и моновоздействие на лиофилизированную форму только УФ оказывается достаточно эффективным.

Обсуждение результатов

Кондиционирование экологических факторов существенным образом отражается на взаимодействии между абиотической бактерицидной системой (пленки диоксида титана) и биотической системой (бактерии). В частности, продемонстрировано существенное влияние времени экспозиции в потоке УФ на бактерицидный эффект TiO₂-пленок. Эти данные соответствуют работе [13], показавшей существенное снижение жизнеспособности *E. coli* в результате 3-часового облучения УФ на поверхности пленок диоксида титана. Последующее увеличение времени уже не отражается существенным образом на количестве гибнущих бактерий. В этой работе анализируется влияние еще одного важного фактора — интенсивности светопотока и показано экспоненциальное снижение жизнеспособности кишечной палочки при увеличении интенсивности УФ.

В наших экспериментах для суспендированных в физиологическом растворе *S. epidermidis* 1061 и *E. coli* 321-5, нанесенных на поверхность пленок диоксида титана, варьирование времени воздействия УФ от 15 до 30 мин не вызывало существенных изменений в жизнеспособности бактерий, тогда как увеличение времени экспозиции до 60 мин повышало

бактерицидный эффект. Стадийность в реализации бактерицидности отмечается также в работе [17], где демонстрируется лишь незначительное подавление жизнеспособности до 30 мин экспозиции, а практически полное подавление жизнеспособности определяется лишь после 90 мин от начала эксперимента. Вместе с тем *S. aureus* 956 демонстрирует принципиально другую динамику: жизнеспособность штамма постоянно снижалась при увеличении времени инкубации. Вероятно, чувствительность к АФК, генерируемым на поверхности TiO₂-пленок, в большей степени обусловлена не принадлежностью бактерий к грамположительным или грамотрицательным (поскольку грамположительный *S. epidermidis* 1061 и грамотрицательная *E. coli* 321-5 обнаруживают одинаковую динамику снижения жизнеспособности), а видовой или штаммовой принадлежностью микроорганизма.

Для использования TiO₂-пленок в области практического здравоохранения важнейшим вопросом является воспроизводимость бактерицидного эффекта при многократном применении. Однако, как было показано в нашей предыдущей работе [4], инкубация суспензии микроорганизмов на поверхности полупроводника в потоке УФ модифицирует свойства TiO₂-пленок, вызывая их гидрофилизацию. Итогом такой модификации является исчезновение бактерицидной активности. Было проведено кондиционирование поверхностей физическим (отжиг) и химическим (бензол) воздействием с целью восстановления первоначальных свойств, в том числе бактерицидной активности. Оба апробированных метода обработки оказались действенными, что подтверждается полным восстановлением биоцидности TiO₂-пленок (см. табл. 2 и 3). Эти методы воздействия на поверхности были выбраны нами, поскольку в условиях стационара физико-химическая обработка инструментария, оборудования, поверхностей, материалов и т. д. является стандартной процедурой при проведении дезинфекции и стерилизации. Термическая обработка может быть использована при нанесении TiO₂-покрытий на хирургический инструментарий, химический метод — при обработке больших площадей, для которых термическая обработка неприменима (в случае нанесения TiO₂-пленок на стены и рабочие поверхности операционных, палат интенсивной терапии и т. д.).

При исследовании взаимодействия между двумя системами можно варьировать свойства не толь-

ко абиотической, но и биотической составляющей. Для количественной оценки жизнеспособности лиофилизированных бактерий, подвергшихся бактерицидному воздействию УФ и АФК, генерируемых на поверхности TiO_2 -пленок, был разработан метод, позволяющий исключить влияние жидкости. В этом случае стандартный посев на плотный МПА с последующим подсчетом КОЕ неприменим, поскольку требует смыва с исследуемой поверхности (стекло или TiO_2 -пленка), а следовательно, гидрофилизует ее и делает повторные исследования невозможными.

Метод, основанный на определении коэффициента экстинкции бактериальной суспензии в МПБ, потребовал введения относительных единиц измерения, поэтому в качестве контрольной точки выбрана жизнеспособность бактерий, выведенных из лиофильного состояния и не подвергшихся никакому внешнему воздействию. Коэффициент экстинкции МПБ такой пробы принимался за 100 %. Показания считывали в момент перехода культуры из экспоненциальной в стационарную фазу роста. По формуле 5 рассчитывали бактерицидность отдельно только УФ и УФ + TiO_2 -пленки. Затем проводили сравнение этих показателей.

В случае исследования лиофилизированных бактерий бактерицидная активность TiO_2 -пленок выше, а наличие воспроизводимости при повторном исследовании (см. табл. 5) обусловлено отсутствием эффекта гидрофилизации. Вместе с тем нужно отметить, что из комплекса реакций, представленных во введении для объяснения механизмов формирования АФК, действенной остается только реакция 4. Реакции взаимодействия дырки с водой (реакции 2 и 3) исключены условиями проведения экспериментов. Тем не менее единственный супероксид-анион-радикал показывает высокую эффективность. Вероятнее всего, это объясняется, во-первых, большей интенсивностью УФ света, попадающего на поверхность пленок диоксида титана в отсутствие воды, во-вторых — непосредственным контактом между бактерией и TiO_2 -пленкой. Поскольку известно, что у супероксид-аниона время жизни короткое (порядка 100 нс), а радиус диффузии мал (около 0,3 мкм) [1], суспендирование бактерий в воде могло явиться критическим фактором для достижения АФК поверхности бактериальной клетки.

Выводы

Эффективность УФ-индуцированной бактерицидности TiO_2 -пленок обусловлена суммарной эффективностью двух ее элементов — УФ и поверхности TiO_2 -пленок. Поэтому кондиционирование каждой составляющей отражается на активности системы. В частности, увеличение времени инкубации в потоке УФ приводит к снижению жизнеспособности бактерий на поверхности пленок диоксида титана, хотя динамика бактерицидности у разных видов микроорганизмов выражена неодинаково.

Не менее важными для реализации бактерицидности являются и свойства TiO_2 -пленок, в частности, гидрофилизация поверхности вызывает утрату

бактерицидной активности, и в данном случае увеличение времени инкубации в потоке УФ практически не сказывается на реализации биоцидного эффекта. Однако восстановить УФ-индуцируемую бактерицидность TiO_2 -пленок можно, вернув им гидрофильные свойства. В данной работе продемонстрировано два эффективных метода обработки поверхностей — высокотемпературный отжиг (450 °С, 3 ч) и воздействие бензолом (1 мл, 24 ч).

В конечном итоге важнейшим фактором, который обычно не учитывается в исследованиях УФ-индуцированной бактерицидности, является жидкость, в которой суспендированы бактерии. Как показывают эксперименты с лиофилизированными бактериями, отсутствие жидкости может существенно увеличить общую биоцидность системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Исследовательской программы Президиума РАН № 24 «Фундаментальные исследования в технологии наноструктур и наноматериалов».

Список литературы

1. Ванько Л. В., Сафронова В. Г., Матвеева Н. К., Сухих Г. Т. Оксидативный стресс в генезе акушерских осложнений. М. : ГЭОТАР Медиа, 2010. 264 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. М. : Изд. дом «Практика», 1999. 462 с.
3. Гржибовский А. М. Типы данных, проверка распределения и описательная статистика // Экология человека. 2008. № 1. С. 52–58.
4. Плескова С. Н., Голубева И. С., Верёвкин Ю. К., Першин Е. А., Буренина В. Н., Королихин В. В. Фотоиндуцированная бактерицидная активность TiO_2 -пленок // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 1. С. 28–32.
5. Семина Н. А., Прямухина Н. С., Жилина Н. Я. Заболеваемость внутрибольничными инфекциями в Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1995. № 2. С. 30–34.
6. Суйковская Н. В. Химические методы получения тонких прозрачных пленок. М. : Химия, 1971. 198 с.
7. Хороших В. М., Белоус В. А. Пленки диоксида титана для фотокатализа и медицины // ФИП PSE. 2009. Т. 7, № 3. С. 223–238.
8. Cheng Y. W., Chan R. C., Wong P. K. // Water Research. 2007. Vol. 41, N 4. P. 842–852.
9. Dancer S. J. Importance of the environment in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning // Lancet Infectious Diseases. 2008. Vol. 8, N 2. P. 101–113.
10. Friberg B., Friberg S., Burman L. G. Correlation between surface and air counts of particles carrying aerobic bacteria in operating rooms with turbulent ventilation: an experimental study // J. Hosp. Infect. 1999. Vol. 42, N 1. P. 61–68.
11. Kochkodan V., Tsarenko S., et al. Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO_2 // Desalination. 2008. Vol. 220, N 1-3. P. 380–385.
12. Koizumi Y., Taya M. Photocatalytic inactivation rate of phage ms2 in titanium dioxide suspensions containing various ionic species // Biotechnology Letters. 2002. Vol. 24, N 6. P. 459–462.

13. Kim J. Y., Park C., Yoon J. Developing a testing method for antimicrobial efficacy on TiO_2 photocatalytic products // *Environmental Engineering Research*. 2008. Vol. 13, N 3. P. 136–140.
14. Matsunaga T., Tomoda R., et al. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders // *FEMS Microbiology Letters*. 1985. Vol. 29, N 1-2. P. 211–214.
15. Palmisano G., Augugliaro V., Pagliaro M., et al. Photocatalysis: a promising route for 21st century organic chemistry // *Chem. Commun.* 2007. Vol. 7. P. 3425–3437.
16. Saito T., Iwase T., Morioka T. Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO_2 on *Mutans streptococci* // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1992. Vol. 14, N 4. P. 369–379.
17. Sunada K., Watanabe T., Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on TiO_2 thin film // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2003. Vol. 156, N 1. P. 227–233.
18. Warner W. G., Yin J. J., Wei R. R. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide // *Free Radical Biology and Medicine*. 1997. Vol. 23, N 6. P. 851–858.

References

1. Van'ko L. V., Safronova V. G., Matveeva N. K., Sukhikh G. T. *Oksidativnyi stress v geneze akusherskikh oslozhenii* [Oxidative stress in genesis of obstetric complications]. Moscow, 2010, 264 p. [in Russian]
2. Glants S. *Mediko-biologicheskaya statistika* [Medical-Biological Statistics]. Moscow, 1999, 460 p. [in Russian]
3. Grjibovski A. M. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2008, no. 1, pp. 52–58. [in Russian]
4. Pleskova S. N., Golubeva I. S., Verevkin Yu. K., Pershin E. A., Burenina V. N., Korolikhin V. V. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology]. 2011, vol. 47, no. 1, pp. 28–32. [in Russian]
5. Semina N. A., Pryamukhina N. S., Zhilina N. Ya. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 1995, no. 2, pp. 30–34. [in Russian]
6. Suikovskaya N. V. *Khimicheskie metody polucheniya tonkikh prozrachnykh plenok* [Chemical methods of production of thin transparent films]. Moscow, 1971, 198 p. [in Russian]
7. Khoroshikh V. M., Belous V. A. *FHIP PSE* [FIP PSE]. 2009, vol. 7, no. 3, pp. 223–238. [in Russian]
8. Cheng Y. W., Chan R. C., Wong P. K. Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation. *Water Research*. 2007, vol. 41, no. 4, pp. 842–852.
9. Dancer S. J. Importance of the environment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. *Lancet Infectious Diseases*. 2008, vol. 8, no. 2, pp. 101–113.
10. Friberg B., Friberg S., Burman L. G. Correlation between surface and air counts of particles carrying aerobic bacteria in operating rooms with turbulent ventilation: an experimental study. *J. Hosp. Infect.* 1999, vol. 42, no. 1, pp. 61–68.
11. Kochkodan V., Tsarenko S., et al. Adhesion of microorganisms to polymer membranes: a photobactericidal effect of surface treatment with TiO_2 . *Desalination*. 2008, vol. 220, no. 1–3, pp. 380–385.
12. Koizumi Y., Taya M. Photocatalytic inactivation rate of phage ms2 in titanium dioxide suspensions containing various ionic species. *Biotechnology Letters*. 2002, vol. 24, no. 6, pp. 459–462.

13. Kim J. Y., Park C., Yoon J. Developing a testing method for antimicrobial efficacy on TiO_2 photocatalytic products. *Environmental Engineering Research*. 2008, vol. 13, no. 3, pp. 136–140.

14. Matsunaga T., Tomoda R., et al. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*. 1985, vol. 29, no. 1–2, pp. 211–214.

15. Palmisano G., Augugliaro V., Pagliaro M., et al. Photocatalysis: a promising route for 21st century organic chemistry. *Chem. Commun.* 2007, vol. 7, pp. 3425–3437.

16. Saito T., Iwase T., Morioka T. Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO_2 on *Mutans streptococci*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1992, vol. 14, no. 4, pp. 369–379.

17. Sunada K., Watanabe T., Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on TiO_2 thin film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2003, vol. 156, no. 1, pp. 227–233.

18. Warner W. G., Yin J. J., Wei R. R. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997, vol. 23, no. 6, pp. 851–858.

CONDITIONING OF PHOTOINDUCED BACTERICIDAL ACTIVITY ON SURFACE OF TITANIUM DIOXIDE FILMS

S. N. Pleskova, I. S. Golubeva, *Yu. K. Verevkin

R. E. Alekseev Nizhny Novgorod State Technical University,
*Institute of Applied Physics of Russian Academy of Sciences,
Nizhny Novgorod, Russia

Special surfaces based on titanium dioxide are developed for prevention of nosocomial infections. The reactive oxygen species (ROS) have been generated by the surfaces after their UV-irradiation. ROS caused destruction of bacteria. However, effectiveness of bactericidal activity of TiO_2 -films depends on several factors. Influence of time of UV irradiation, thermal (annealing) and chemical (benzene) treatment of films on the bactericidal activity, as well as the bactericidal effect against suspended and lyophilized bacteria have been studied. Three clinical isolates *Staphylococcus aureus* 956, *Staphylococcus epidermidis* 1061, *Escherichia coli* 321-5 have been used. Viability of the suspended bacteria has been determined with use of the classical method of counting CFU, viability of lyophilized bacteria has been determined with use of the method of estimation of coefficients of bactericidal extinction of control and test samples.

It has been shown that the bactericidal effect of thin films against all strains increased with an increase in the flow of UV exposure. Thermal and chemical treatment caused bactericidal activity recovery which was lost during the initial incubation of the bacterial suspension on the surface. Absence of fluid in the system increased the bactericidal activity of TiO_2 -films.

Keywords: bactericidal activity, titanium dioxide films

Контактная информация:

Плескова Светлана Николаевна — доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии, физической и аналитической химии ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный технический университет им. Р. Е. Алексеева» Минобрнауки России

Адрес: 603950, ГСП-41, Н. Новгород, ул. Минина, д. 24, стр. 1

E-mail: pleskova@mail.ru