

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЕРАМИЧЕСКОЙ ПЛИТКИ

О.Е. Нежвинская, О.А. Емельянова

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический
центр гигиены», г. Минск, Республика Беларусь*

Резюме. Эффективность антимикробного покрытия керамической плитки была оценена с помощью метода ИСО 22196:2007 и Инструкции 2.1.2.10-12-38-2006. Результаты исследования показали, что все опытные образцы обладали антимикробной активностью в отношении штаммов *Escherichia coli* (E.coli) ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* (S.aureus) ATCC 6538, в то время как контрольные образцы без антимикробного покрытия не оказывали влияния на размножение и рост микроорганизмов.

Ключевые слова: антимикробная активность, антимикробное покрытие, керамическая плитка, чистые помещения.

Summary: The effectiveness of antibacterial surface coating of ceramic tiles was estimated using ISO 22196:2007 and the Instruction 2.1.2.10-12-38-2006. The results showed that all samples had antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* (E.coli) ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* (S.aureus) ATCC 6538, whereas controls without antibacterial surface coating had no effect on growth and reproduction of microorganisms.

Key words: antibacterial, antibacterial surface coating, ceramic tile, cleanrooms.

Введение. Микробиологическое загрязнение помещений играет важную роль в распространении и передаче инфекционных заболеваний, в том числе госпитальных инфекций. Обработка поверхностей

дезинфицирующими средствами позволяет снизить концентрацию патогенных микроорганизмов, однако данный эффект является непродолжительным и спустя некоторое время происходит их повторная контаминация [1, 2]. Кроме того, нерациональное использование дезинфицирующих средств в организациях здравоохранения зачастую приводит к появлению устойчивых штаммов микроорганизмов.

Строительные материалы, применяемые для внутренней отделки помещений, к которым предъявляются особые требования к санитарно-эпидемиологическому режиму, не должны стимулировать рост и развитие микрофлоры, в том числе патогенной, и должны быть устойчивы к влажной дезинфекции. Использование для внутренней отделки «чистых помещений» строительных материалов с заданными антимикробными свойствами позволяет обеспечить минимальный уровень контаминации поверхностей патогенными и условно-патогенными микроорганизмами [3].

В настоящее время многие производители облицовочных материалов включают свой ассортимент керамическую плитку, при изготовлении которой реализована технология антибактериальной защиты. Данная технология заключается в специальной обработке керамических материалов биологически активными веществами, которые при контакте бактерий с поверхностью плитки проникают через клеточную стенку и нарушают клеточные функции, не позволяя микроорганизмам расти и размножаться. В отличие от дезинфицирующих средств, дающих разовый кратковременный эффект, антимикробное покрытие обладает длительным бактерицидным действием на протяжении всего срока службы и обеспечивает чистоту поверхности между уборками. Это делает перспективным использование антимикробной плитки в помещениях с повышенными гигиеническими требованиями, таких, как учреждения здравоохранения, фармакологические и пищевые производства [4].

Для изучения антимикробной активности полимерных строительных материалов используют три основных метода: диффузионный, капельный и аэрозольный. Два последних метода являются количественными и в лабораторных условиях имитируют реальные условия эксплуатации и возможного заражения строительных материалов инфекционными агентами. Однако, в Республике Беларусь нет разработанных методов для оценки антимикробной активности керамической плитки, исследование которой характеризуется некоторыми техническими особенностями. Кроме того, не разработан критериальный аппарат для оценки степени выраженности антимикробной активности керамической плитки для возможности ее применения для облицовки «чистых помещений».

Целью данной работы являлось проведение сравнительной характеристики капельного метода оценки антибактериальной активности строительных материалов согласно Инструкции 2.1.2.10-12-38-2006 «Гигиеническая оценка полимерных и полимерсодержащих материалов, изделий и конструкций, предназначенных для применения в промышленном и гражданском строительстве» и метода ИСО 22196:2007 «Пластмассы. Оценка антимикробной активности на поверхности пластмассовых изделий». Оба этих метода позволяют исследовать образцы строительных материалов, имеющих непористую рабочую поверхность.

Материалы и методы. Объектом исследования служили образцы плитки керамической глазурованной, произведенной в Республике Беларусь. Было исследовано 3 опытных образца с антимикробным покрытием и 3 контрольных образца без антимикробного покрытия. Каждый образец исследовался в 6 повторностях, размер плитки составлял 30 × 30 мм. Оценка антимикробной активности представленных образцов была проведена в соответствии с Инструкцией 2.1.2.10-12-38-2006 и ИСО 22196:2007. В качестве тест-штаммов микроорганизмов использовались суточные культуры музейных штаммов *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, обладающие типичными морфологическими характеристиками и являющимися представителями условно-патогенной микрофлоры человека. Как представители грамотрицательной и грамположительной микрофлоры данные штаммы могут характеризоваться различной устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов среды, что обусловлено различием в строении клеточной стенки бактерий и подтверждается литературными данными [4, 5]. Для предупреждения нецелевой контаминации образцы перед исследованием дезинфицировали путем погружения в 70 % раствор этилового спирта.

Образцы в асептических условиях помещали в стерильные чашки Петри и контаминировали суспензией микроорганизмов заданной концентрации. После инкубации определяли количество жизнеспособных клеток микроорганизмов на поверхности образцов керамической плитки.

При исследовании антимикробной активности плитки по Инструкции 2.1.2.10-12-38-2006 поверхности испытуемых образцов контаминировали капельным способом путем нанесения 0,5 мл рабочей культуры тест-штаммов в концентрации 10^5 КОЕ/мл. Для определения динамики антимикробного действия проводили инкубацию образцов в течение 0, 12 и 24 часов при температуре 22°C. После инкубирования образцы отмывали путем погружения в 100 мл стерильного физиологического раствора и высевали по 1 мл последовательных десятикратных разведений смывной жидкости на поверхность мясопептонного агара. Посевы инкубировали в

течение 24 часов при $37\pm 1^\circ\text{C}$. После инкубации подсчитывали все выросшие на чашках Петри колонии. Для определения антимикробной активности проводили сравнение количества колоний в посевах смывной жидкости опытных и контрольных образцов, вычисляли коэффициент выживаемости микроорганизмов.

Выполнение исследования согласно методике ИСО 22196:2007 проводили следующим образом: 0,4 мл суточной культуры тест-штаммов в концентрации $4,5 \times 10^5$ КОЕ/мл наносили на поверхность каждой плитки, накрывали стерильной полиэтиленовой пленкой размером 25×25 мм для предупреждения высыхания и помещали в стерильные чашки Петри. Сразу после нанесения бактериальной культуры 3 из 6 плиток в каждом контрольном образце обрабатывали 10 мл бульона Eugon для нейтрализации действия антимикробных агентов. Из полученной смывной жидкости готовили ряд десятикратных серийных разведений в фосфатно-буферном растворе. По 1 мл каждого разведения и 1 мл бульона Eugon помещали в стерильные чашки Петри, заливали 15 мл мясопептонного агара и инкубировали 40–48 часов при $37\pm 1^\circ\text{C}$. Остальные образцы плитки с нанесенной бактериальной культурой инкубировали в течение 24 часов при $37\pm 1^\circ\text{C}$ и относительной влажности $>75\%$. По окончании инкубации с этими образцами проводили манипуляции, аналогичные действиям с контрольными образцами, описанным выше. На чашках Петри с мясопептонным агаром подсчитывали число выросших колоний.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования антимикробной активности образцов керамической плитки, выполненного в соответствии с Инструкцией 2.1.2.10-12-38-2006, приведены в Таблице 1.

Таблица 1 - Оценка антимикробной активности образцов плиток керамических, контаминированных тест-штаммами капельным методом в соответствии с Инструкцией 2.1.2.10-12-38-2006

Тест-штамм	Контрольный образец 1			Опытный образец 1		
	0 мин	12 час	24 ч	0 мин	12 час	24 ч
E.coli ATCC 8739	$2,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$4,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
S.aureus ATCC 6538	$4,4 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
Тест-штамм	Контрольный образец 2			Опытный образец 2		
	0 мин	12 час	24 ч	0 мин	12 час	24 ч
E.coli ATCC 8739	$5,7 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	$6,1 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$
S.aureus ATCC 6538	$6,6 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$	$5,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
Тест-штамм	Контрольный образец 3			Опытный образец 3		
	0 мин	12 час	24 ч	0 мин	12 час	24 ч
E.coli ATCC 8739	$1,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$6,7 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$7,7 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$

S.aureus ATCC 6538	2,3 x10 ⁴	1,8x10 ⁴	8,5x10 ³	2,1 x10 ⁴	3,5 x10 ³	6,5 x10 ²
--------------------	----------------------	---------------------	---------------------	----------------------	----------------------	----------------------

В результате проведенных исследований установлено, что, как в опытных образцах с антимикробным покрытием, так и в контрольных образцах, наблюдалась выраженная динамика гибели микроорганизмов. Так, для опытного образца №1 за 12 часов экспозиции концентрация бактерий тест-штамма *E. coli* ATCC 8739 снизилась – в 5,7 раз, а за 24 часа – в 25 раз по сравнению с исходной. Для контрольного образца №1, идентичного по своим характеристикам опытному образцу №1 за исключением отсутствия противомикробного покрытия, концентрация бактерий штамма *E. coli* ATCC 8739 за 12 часов снизилась в 1,1 раза, а за 24 часа – в 1,2 раза. При использовании тест-штамма *S. aureus* ATCC 6538, в опытном образце №1 за 12 часов инкубации количество жизнеспособных микроорганизмов уменьшилось в 8,2 раза и за 24 часа – в 25 раз. Для контрольного образца №1 данное отношение составило 1,07 и 1,1 для 12 и 24 часов инкубации соответственно.

Схожая тенденция наблюдалась и для двух других пар образцов плитки. За 24 часа инкубации количество микроорганизмов на поверхности всех опытных образцов уменьшилось на 1-2 порядка. В то же время, почти для всех контрольных образцов концентрация бактерий за 24 часа хоть и снизилась, но, тем не менее, осталась в пределах порядка, наблюдаемого в начале исследования. Это свидетельствует о том, что опытные образцы керамической плитки характеризуются значительно более низкой выживаемостью микроорганизмов по сравнению с контролем, и, следовательно, обладают антимикробной активностью в отношении штаммов *E. coli* ATCC 8739 и *S. aureus* ATCC 6538.

При исследовании образцов плитки в соответствии с методом ИСО 22196:2007 антимикробная активность исследуемого образца рассчитывалась по формуле (1):

$$R=(U_t-U_0)-(A_t-U_0), \quad (1)$$

где R - антимикробная активность;

U_t – количество жизнеспособных микроорганизмов в lg КОЕ/мл после 24 часов инкубации в контрольном образце;

U_0 - количество жизнеспособных микроорганизмов в lg КОЕ/мл после 0 часов инкубации в контрольном образце;

A_t - количество жизнеспособных микроорганизмов в lg КОЕ/мл после 24 часов инкубации в опытном образце.

Результаты исследований представлены в Таблице 2:

Таблица 2 - Оценка антимикробной активности образцов плиток керамических, контаминированных тест-штаммами в соответствии ИСО 22196:2007

Тест-штамм	Контрольный образец 1		Опытный образец 1	Антимикробная активность (R)
	0 часов (U_0)	24 часа (U_t)	24 часа (A_t)	
E.coli ATCC 8739	4,4 ¹⁾	4,2	3,1	1,13
S.aureus ATCC 6538	4,6	4,3	3,2	1,12
Тест-штамм	Контрольный образец 2		Опытный образец 2	Антимикробная активность (R)
	0 часов (U_0)	24 часа (U_t)	24 часа (A_t)	
E.coli ATCC 8739	3,8	3,8	1,9	1,91
S.aureus ATCC 6538	4,0	3,9	2,1	1,77
Тест-штамм	Контрольный образец 3		Опытный образец 3	Антимикробная активность (R)
	0 часов (U_0)	24 часа (U_t)	24 часа (A_t)	
E.coli ATCC 8739	4,2	3,9	2,5	1,41
S.aureus ATCC 6538	4,2	4,0	2,6	1,42

Примечание: 1) Количество микроорганизмов представлено как среднее арифметическое по результатам трех повторностей в lg КОЕ/мл.

Согласно проведенным исследованиям антимикробной активности в соответствии с ИСО 22196:2007 опытный образец плитки керамической №1 обладает антимикробной активностью в отношении штаммов E. coli ATCC 8739 (R = 1,13) и S. aureus ATCC 6538 (R = 1,12), опытный образец плитки керамической №2 обладает антимикробной активностью в отношении штаммов E. coli ATCC 8739 (R = 1,91) и S. aureus ATCC 6538 (R = 1,77), опытный образец плитки керамической №3 обладает антимикробной активностью в отношении штаммов E. coli ATCC 8739 (R = 1,41) и S. aureus ATCC 6538 (R = 1,42); контрольные образцы плитки керамической не обладают антимикробной активностью в отношении тестируемых микроорганизмов.

Выводы. В результате проведенных исследований установлено, что методы определения антимикробной активности полимерных материалов могут использоваться для исследования образцов плитки керамической. Данные, полученные при оценке антимикробной активности плитки керамической методами, описанными в Инструкции 2.1.2.10-12-38-2006 и

ИСО 22196:2007, являются сопоставимыми и могут быть использованы для последующих исследований новых композиций антимикробных покрытий строительных материалов. Разница в количестве выживших клеток микроорганизмов после 24 часов инкубации на тест-образцах и контрольных плитках при исследовании различными методами обусловлена тем, что для предупреждения преждевременной гибели микроорганизмов в методе ИСО прописан этап накрывания культуры микроорганизмов полиэтиленовой пленкой и культивирование штаммов в условиях повышенной влажности. Поэтому, при расчете коэффициента антибактериальной активности керамической плитки необходимо обязательно принимать во внимание используемый метод в связи с отсутствием стандартизированного.

Литература

1. Novel antibacterial silver-silica surface coatings prepared by chemical vapour deposition for infection control / S. Varghese [et al] // Journal of Applied Microbiology. – 2013. – V.115. – P.1107–1116.
2. Whyte, W. Operating a cleanroom: Contamination control / W. Whyte // Cleanroom Technology: Fundamentals of Design, Testing, & Operation / W. Whyte. –Wiley & Sons, 2001.
3. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Контроль биозагрязнений. Часть 1. Общие принципы и методы : ГОСТ ИСО 14698-1-2005. – Введ. 01.07.2006. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2006. – 23 с.
4. Фотокаталитическая и фотобиоцидная активность композитных пленок на основе наноструктурного диоксида титана / Л.И. Антоновская [и др.] //Вестник БГУ.– 2008. – №2. – с. 3–8.
5. Воздействие неравновесной плазмы несамостоятельного тлеющего разряда атмосферного давления на вегетативные клетки бактерий / Е.С. Дрозд [и др.] // Физика низкотемпературной плазмы – 2011: материалы Всероссийской (с международным участием) конференции (21-27 июня 2011г.): в 2 т. Петрозаводск: ПетрГУ.2011. – Т.2. – 260 с. С. 114-120.