

Актуальность темы. Уникальные физико-химические свойства, которыми обладают наноматериалы, требуют изучения возможных рисков и вреда, наносимых человеку и окружающей среде. В настоящее время проводятся всесторонние исследования токсикологической безопасности наноматериалов. Использование микроорганизмов для оценки биосовместимости имплантатов сводится, главным образом, к определению их мутагенности и генотоксичности, хотя и прослеживается тенденция к более широкому применению бактериальных тест-систем [1]. Развиваются модели *in silico* и *in vitro* для замены животных при исследовании наноматериалов [2]. Исследование токсичности имплантационных материалов в опытах *in vitro* с использованием культур клеток — надежный метод доклинической оценки их биосовместимости. Эксперимент *in vitro* имеет преимущество достаточно простого контроля экспериментальных факторов, что является одной из наиболее значимых проблем при выполнении эксперимента *in vivo*. С этой целью применяются культуры фибробластов, лимфоцитов, макрофагов и эпителиальных клеток, разработаны тесты *in vitro* с бактериальными тест-системами [3]. Влияние материала оценивают по таким показателям как изменение морфологических свойств, ингибирование роста и развития клеточной популяции, угнетение метаболической активности и др. Использование микроорганизмов в качестве тест-объектов обладает рядом преимуществ: - благодаря малым размерам микроорганизмы имеют большую площадь контакта с окружающей средой; - высокая скорость роста и размножения позволяет за относительно короткое время проследить влияние вещества на несколько поколений микроорганизмов; - возможность проанализировать действие фактора на морфологические, физиологические, генетические свойства и т.д.; - тесты с использованием микроорганизмов дешевле, чем тесты с использованием культур клеток. Тест-организмом для оценки неспецифической токсичности может быть любой микроорганизм, не требующий особых условий культивирования [4]. Для изучения биостойкости материалов применяются различные методы. В большинстве своем они являются модификацией нескольких основных методов, которые по критерию оценки защитной способности можно отнести к двум группам [5]. В первой группе критерием является оценка сохранения физико-химических показателей материала под действием агентов биоповреждений, во второй — задержка и подавление роста микроорганизмов на твердой поверхности (образование зоны биоцидного действия) или в растворе (жидкой среде). При этом наиболее часто в качестве модельных объектов используются прокариоты. Во-первых, из-за их наибольшей распространенности в окружающей среде и способности обуславливать наиболее широкий круг заболеваний человека и животных. Во-вторых, из-за простоты организации и легкости их культивирования [6, 7]. Гораздо меньшее внимание уделено в этом вопросе вирусам и еще меньше — представителям эукариот [8]. Известно, что многие эукариотические

микроорганизмы, в том числе и дрожжи, легко распространяются в воздушных массах, могут оседать в помещениях на поверхностях стен и потолков и способны представлять потенциальную опасность для человека. Практически в организме человека нет ни одного органа, который бы не мог поражаться дрожжами [9]. Аллергены дрожжей могут поступать в организм человека извне (вдыхание, прием с пищей) или путем постоянной утилизации метаболитов культур, носителем которых он является. Дрожжи являются неотъемлемой составляющей в жизни человека - без них невозможны важнейшие биотехнологические процессы хлебопечения и виноделия, пивоварения и сыроварения. В этих процессах задействованы в основном дрожжи сахаромицеты. Однако спектр известных на сегодня истинных дрожжей включает свыше 700 видов (более 100 родов). Большая часть этих дрожжей обитает в природных экосистемах, но некоторые из них ассоциированы с различными заболеваниями человека. На данный момент насчитывают 9 родов (36 видов) клинически значимых дрожжей, некоторые из которых принимают участие в развитии заболеваний аллергического характера [10]. Из 36 видов клинически значимых дрожжей роль в провокации аллергических заболеваний достоверно установлена лишь для *Candida utilis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Malassezia furfur* [9,11,12,13]. В настоящее время уделяется большое внимание изучению взаимодействия микроорганизмов с металлами, что связано с их ключевой ролью в различных биотехнологических и многих природных процессах [3]. Постоянно ведутся работы по разработке новых сплавов и материалов, обладающих необходимыми свойствами, среди которых следует выделить кобальт-хром-молибденовые, титановые и циркониевые сплавы [20, 21]. Важной задачей прикладной микробиологии является создание и исследование «самостерилизующихся» поверхностей, то есть, тех, на которых происходит инактивация и уничтожение микроорганизмов [22]. Нитрид титана - один из материалов, который может оказывать влияние на функционирование микроорганизмов. Установлено, что поверхность титана является идеальной подложкой для колонизации и образования биопленки. Иммобилизация бактерий на поверхности титана может приводить как к снижению, так и к повышению их ферментативной активности. В научно-технической литературе хорошо освещены исследования, предметом которых были токсичность наиболее распространенных видов техногенных наночастиц оксида титана. Активно обсуждаются токсичность и безопасность применения наночастиц в медицине, пищевой и микробиологической промышленности [23]. Биостойкость или биоцидное действие в жидкой и воздушной среде исследуются методами с использованием стандартных наборов микроорганизмов или специально выделенных с поврежденных материалов штаммов микроорганизмов - биодеструкторов. Многолетние исследования взаимосвязи между физическими свойствами и фотокаталитической активностью TiO_2 и Pt/TiO_2 в процессах

очистки и дезинфекции воздуха и воды, показали более высокую способность платинированного диоксида титана по сравнению с диоксидом титана к дезинфекции и полной минерализации микроорганизмов [24]. Методами фурье-ИК-спектроскопии неполного внутреннего отражения изучена кинетика фотокаталитического окисления грамотрицательных бактерий *E. coli* и основных компонент мембраны стенки клетки на пористой пленке из наноразмерных частиц диоксида титана. Показано, что органический материал мембраны стенки бактериальной клетки восстанавливает «дырку» в валентной зоне диоксида титана [25]. Продemonстрировано снижение числа КОЕ грамположительных и грамотрицательных бактерий при инкубации их на поверхности TiO_2 - пленок, облученных УФ (380 нм) [22]. Отмечено снижение жизнеспособности бактерий после 15 - минутной экспозиции для *Staphylococcus aureus* на 29 %, для *Staphylococcus epidermidis* - на 45 %, для *Escherichia coli* - на 47 %. Результаты исследования чувствительности модельных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к фотоинактивирующему действию активных кислородных соединений генерируемых на поверхности диоксида титана, представлены в работе [8]. Показано, что фотоинаktivация дрожжей имеет гораздо более выраженный характер по сравнению с фотоинаktivацией бактерий. Созданию апатитантибактериального композитного покрытия на титановом субстрате с использованием термодепозитной технологии посвящена работа [26]. В данной работе поверхность модельного имплантата, титановой пластины, была покрыта биологически-активным веществом - гидроксилapatитом, который обеспечивает биосовместимость. Альтернативой к существующим методам получения биостойких материалов может стать высокочастотная плазменная обработка поверхности титана [27]. В работе [28] поверхность металла, помещенного в высокочастотное (ВЧ) поле плазмы пониженного давления, подвергалась бомбардированию потоком ионов. В результате удаляются поверхностные загрязнения, включая оксидные пленки, технологические смазки и снижается шероховатость поверхности металлов. Для использования современных достижений нанотехнологий в медицине, биотехнологии, пищевой промышленности необходимо обратить особое внимание на исследования биологического действия наночастиц нитрида титана на дрожжевые и бактериальные клетки. Перспектива использования наночастиц нитрида титана в биотехнологии и пищевой промышленности обусловлена не только их биоцидным эффектом, но и тем, что они могут прочно удерживаться на поверхности изделий. Механизм действия наночастиц нитрида титана на живые клетки остается невыясненным. За исключением предварительных данных скрининговых исследований, показавших ингибиторное влияние наночастиц на развитие ряда микроорганизмов [2]. В работах, посвященных изучению влияния титановых сплавов на микрофлору полости рта в стоматологическом протезировании [29 - 34] исследуется действие имплантационных материалов на

представителей естественной микрофлоры. Известно, что после введения в организм имплантатов их компоненты вступают в контакт как с клетками окружающих тканей, так и со всей внутренней средой организма [34 - 38]. Поэтому при изучении биосовместимости имплантационных материалов важно исследовать не только их токсичность по отношению к эукариотическим клеткам, но и влияние их на представителей нормофлоры. Установлено, что многие соединения обладают одинаковой токсичностью по отношению к микроорганизмам и культурам клеток человека: у материалов с высокой антибактериальной активностью обычно обнаруживаются выраженные цитотоксические и мутагенные свойства [1]. В работе [4] представлена схема изучения биосовместимости титановых сплавов с использованием бактерий рода *Bifidobacterium* в модельных опытах *in vitro* и проведена оценка неспецифической токсичности титановых сплавов марок ВТ 1 - 0 и ВТ - 6. Показано отсутствие ингибирующего и токсического действия титановых сплавов на развивающиеся популяции бифидобактерий. Одним из путей нейтрализации негативного влияния соединений на основе титана на живые организмы является модификация его поверхности с целью придания ему биосовместимых свойств. При оценке модифицированных наноматериалов необходимо найти принципиально новые процедуры изучения токсичности и нанобезопасности, получаемых материалов [2]. Цель работы: - исследование влияния модифицированной наноструктурированной поверхности нитрида титана на жизнедеятельность микроорганизмов. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: определяли влияние модифицированной наноструктурированной поверхности нитрида титана на рост тест-культур дрожжей *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*; определяли влияние модифицированной наноструктурированной поверхности нитрида титана на жизнеспособность тест-культуры бактерий *Azotobacter chroococum* 12. Материалы и методы Модифицированная поверхность экспериментальных образцов из титанового сплава марки ВТ-1 была получена путем газонасыщения ионов азота в плазме высокочастотного разряда. Исследуемые образцы имеют физико-механические характеристики представленные в таблице 1. Образцы из титанового сплава марки ВТ-1 вносились в питательные среды в виде пластин размером 30 × 10 мм. Определение влияния образцов из титанового сплава марки ВТ-1 на рост тест-культур дрожжей *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* проводили на плотной (твердой) среде. Таблица 1 – Физико-механические свойства образцов, покрытых нитридом титана № образца Время обработки т (мин) Анодный ток IА Шероховатость RA (мкм) Микротвердость Н (ГПа) 1 10 1,0 0,93 1800 2 20 1,0 0,81 1920 3 30 1,0 0,79 1960 4 30 2,5 0,81 1650 5 30 2,0 0,59 2240 Морфологические свойства дрожжей исследовались методом микроскопирования на видеомикроскопе LC-100 (Австрия). В чашки Петри заливали питательную среду и помещали испытуемый образец. После

застывания питательной среды на поверхность наносили суспензию тест-культуры дрожжей *Candida utilis* и *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих 107 КОЕ/мл [39, 40, 41, 42]. Инкубацию проводили в термостате в течение 4 суток при температуре 32 — 37 °С. По окончании инкубации рост тест-культур дрожжей *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* оценивали в баллах по степени обрастания и размера зоны задержки роста тест - культуры. Оценка роста культур в баллах: 1 балл — над образцом интенсивность роста такая же, как и вокруг образца; 2 балла — отдельные проросшие колонии над образцом; 3 балла — над образцом рост культур полностью подавлен; 4 балла — вокруг образца имеется зона задержки роста микроорганизмов не более 2 мм; 5 баллов — вокруг образца имеется зона задержки роста более 2 мм. Влияние образцов из титанового сплава марки ВТ-1 на жизнеспособность тест-культуры бактерий *Azotobacter chroococcum* 12 изучалось в жидкой питательной среде. Бактерии *Azotobacter chroococcum* 12 выращивались на среде Эшби с сахарозой, имеющей следующий состав (г) [29]: сахароза — 20,0; K₂HPO₄ — 0,2; MgSO₄ * 7H₂O — 0,2; NaCl — 0,2; K₂SO₄ — 0,1; CaCO₃ — 5,0; вода дистиллированная — 1000 мл. В среду вносилась смесь микроэлементов 1 мл/л. Раствор микроэлементов (по Федорову) (г) [43]: H₃BO₃ — 5,0; (NH₄)₂ MoO₄*2H₂O — 5,0; ZnSO₄-7*H₂O — 0,2; KI и NaBr — по 0,5; Al₂(SO₄)*18H₂O — 0,3; вода дистиллированная — 1000 мл. Культивирование бактерий *Azotobacter chroococcum* 12 осуществлялось при 28 °С в колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды. На дно колбы помещались образцы, которые заливались жидкой питательной средой, затем вносилась культура бактерий *Azotobacter chroococcum* 12. Время культивирования составляло шесть суток. В качестве инокулюма использовали суточную культуру бактерий *Azotobacter chroococcum* 12. Исходная концентрация клеток составила - 5×10⁶ кл/мл. Количество жизнеспособных клеток оценивали по численности выросших на твердой питательной среде колоний после высева суспензии из серийных десятикратных разведений. Результаты и их обсуждение

Результаты оценки влияния образцов из титанового сплава марки ВТ-1 на рост тест-культур дрожжей *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Влияние образцов из титанового сплава марки ВТ-1 на развитие дрожжей *Candida utilis* и *Saccharomyces cerevisiae* № образца

Влияние образцов из титанового сплава марки ВТ-1 на рост и развитие дрожжей *Candida utilis* *

Влияние образцов из титанового сплава марки ВТ-1 на рост и развитие дрожжей *Saccharomyces cerevisiae** Контроль-ный 1 1 1 1 2 3 1 3 2 1 4 4 1 5 2 1 * - рост и развитие культур оценивают в баллах

Из таблицы 2 следует, что исследуемые материалы не оказывают отрицательного эффекта на скорость роста и развитие дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Скорость роста и развития дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выращенных в присутствии образцов титановых сплавов, соответствовала контрольным вариантам. Изучение формирования биопленки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на поверхности титановых

материалов показало, что использованный в работе штамм дрожжей через 24 — 48 часов культивирования в модельных условиях образовывал биопленку, которая увеличивалась по площади и плотности в течение всего времени инкубации. При этом культуры одинаково хорошо росли на плотной питательной среде, границе агар — сплав и на поверхности исследуемых материалов. Изменения морфологических свойств дрожжей *Saccharomyces cerevisia* не наблюдалось. Через 6 дней инкубации в модельных условиях поверхность титановых сплавов была покрыта многослойной биопленкой, состоящей из жизнеспособных микроорганизмов. Изучение морфологических свойств дрожжей *Saccharomyces cerevisia*, изолированных из биопленки, показало, что клетки дрожжей отличаются небольшими размерами. Образование инволюционных форм с аномальной морфологией не отмечалось. В таблице 2 представлена индивидуальная чувствительность культуры дрожжей *Candida utilis* к изучаемым сплавам. В отдельных случаях наблюдалось наличие ингибирующего эффекта. Так, в присутствии в среде культивирования образцов № 2 и № 4, отмечалось снижение накопления биомассы дрожжей и более выраженный подавляющий эффект на развитие популяции. При этом данные образцы имеют максимальные показатели шероховатости поверхности 0.81 мкм. Для остальных образцов присутствие исследуемых материалов не приводило к понижению или повышению уровня накопления биомассы. Визуальных отличий в морфологии колоний, сформировавшихся после посева из контрольных и опытных вариантов, обнаружено не было. Они имели типичную форму. Микроскопические исследования культуры дрожжей *Candida utilis* показали, что титановые сплавы не вызывали видимых на светооптическом уровне изменений морфологических свойств дрожжей. Образования форм, характерных для культур, выращенных в неблагоприятных условиях или в присутствии токсических соединений, не наблюдалось. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии токсического действия титановых сплавов на развитие дрожжей *Candida utilis* и *Saccharomyces cerevisiae*. Исследования по изучению долговременного влияния образцов нитрида титана на жизнеспособность бактерий *Azotobacter chroococcum* 12 представлены в таблице 3. Как следует из данных таблицы 2 наблюдается индивидуальная чувствительность тест-культуры к титановым сплавам. Численность жизнеспособных клеток *Azotobacter chroococcum* 12 через 48 часов культивирования в присутствии сплавов № 3 и № 5 резко возрастает. Прирост бактерий в присутствии образца № 3 составляет 73 %, а у образца № 5 – 108% по сравнению с контрольным образцом. В то же время наблюдается потеря жизнеспособных клеток в присутствии образца № 2 и № 4 на 25 %. В целом среднее сохранение жизнеспособности *Azotobacter chroococcum* 12 было отмечено в среде со сплавом № 1. При анализе данных таблицы 1 и 3 прослеживается взаимосвязь состояния поверхности образцов с процессами развития бактерий

Azotobacter chroococum 12. Таблица 3 - Численность жизнеспособных клеток Azotobacter chroococum 12 при выращивании в среде Эшби после 48 часов культивирования № образца Численность жизнеспособных клеток Azotobacter chroococum 12 при выращивании в среде Эшби после 48 часов культивирования, кл/мл ·10⁸ контрольный 300 1 350 2 225 3 520 4 225 5 625 Минимальной шероховатости образца № 5, соответствующей 0,59 мкм, соответствует максимальный прирост бактерий Azotobacter chroococum 12 – 108 % по сравнению с контролем. При повышении шероховатости у образца № 3 до 0,79 мкм по сравнению с образцом № 5 прослеживается снижение жизнеспособности бактерий с 625 кл/мл ·10⁸ до 520 кл/мл·10⁸. Дальнейшему повышению шероховатости образцов № 1, 2 и 4 до 0,81 – 0,93 мкм соответствует снижение жизнеспособности бактерий до 350 – 225 кл/мл·10⁸. При повышении показателя микротвердости с 1650 ГПа у образца № 4 до 2240 ГПа у образца № 5, т.е. на 35,8 %, наблюдается повышение жизнеспособности бактерий Azotobacter chroococum 12 с 225 кл/мл·10⁸ до 625 кл/мл·10⁸, что составляет 178 %. Изучение морфологических свойств бактерий Azotobacter chroococum 12, показало, что образование инволюционных форм с аномальной морфологией не отмечалось. Выводы Показано, что дрожжи Candida utilis и Saccharomyces cerevisiae, а так же бактерии Azotobacter chroococum 12 можно использовать как тест-культуры для оценки биосовместимости титановых сплавов в опытах in vitro.