


# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ И ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА В ГИГИЕНЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ

УДК 628.19: [579.66: 620.3]  
DOI: 10.21668/health.risk/2018.3.11

Читать  
онлайн 

## ТЕСТ-МОДЕЛЬ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ КРИТЕРИАЛЬНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИМИКРОБНОГО ПОТЕНЦИАЛА НАНОМАТЕРИАЛОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ВОДООЧИСТКИ И ВОДОПОДГОТОВКИ: ОБОСНОВАНИЕ И МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

Н.В. Дудчик, Е.В. Дроздова, С.И. Сычик

Научно-практический центр гигиены, Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8

*Снижение рисков для здоровья населения при потреблении питьевой воды систем централизованного водоснабжения – актуальная медико-биологическая и техническая проблема. Решается она, в том числе, посредством разработки и применения новых материалов для водоочистки и водоподготовки. Ряд природных и сконструированных наноматериалов обладает антимикробными свойствами в отношении микроорганизмов различной таксономической принадлежности (бактерий, дрожжеподобных и плесневых грибов) и бактериальных биопленок. Однако ряд результатов оценки антимикробного потенциала наноматериалов носит противоречивый и часто лишь качественный/полуколичественный характер вследствие отсутствия стандартного протокола испытаний и обоснованного критериального аппарата оценки. Целью настоящей работы было методологическое обоснование и разработка унифицированной и стандартизированной тест-модели, оптимизация параметров методики и обоснование системы критериев количественной оценки антимикробной активности наноматериалов, применяемых в условиях водоочистки и водоподготовки.*

*Объектом исследования были образцы наноматериалов на основе диоксида титана, используемые для технологической водоочистки и водоподготовки. Обоснована тест-модель, предложен критериальный показатель  $R_{DDS}$ , разработан стандартный протокол испытаний для количественной оценки антимикробного потенциала наноматериалов.*

*Проведена апробация разработанной технологии на образцах наноматериалов на основе диоксида титана. Рассчитаны и оценены метрологические параметры метода (стандартное отклонение повторяемости и предел повторяемости), которые соответствуют предъявляемым к методам требованиям при принятой доверительной вероятности  $p = 95\%$ , а также требованиям международной организации по стандартизации ИСО и принципам надлежащей лабораторной практики GLP. Подтверждена релевантность тест-модели, которая обеспечивает объективную количественную оценку антимикробного потенциала материалов, используемых для обеззараживания водных объектов, контаминированных микробиотой смешанной таксономической принадлежности, контроля и предотвращения распространения бактериальных инфекций с водным путем передачи.*

**Ключевые слова:** наноматериалы, тест-модель, антимикробный потенциал, диоксид титана, количественный критериальный показатель  $R_{DDS}$ , метрологическая оценка.

Снижение рисков для здоровья населения при потреблении питьевой воды систем централизованного водоснабжения – актуальная медико-биологическая и техническая проблема, которая решается, в том числе, посредством разработки и применения новых материалов для водоочистки и водоподготов-

ки [1–5]. Ряд природных и сконструированных наноматериалов на основе оксида титана ( $TiO_2$ ) [6–8], оксида цинка ( $ZnO$ ) [9], серебра [10–13] и более сложного состава [7, 14–18] обладают антимикробными свойствами в отношении микроорганизмов различной таксономической принадлежности (бак-

© Дудчик Н.В., Дроздова Е.В., Сычик С.И., 2018

Дудчик Наталья Владимировна – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией микробиологии (e-mail: n\_dudchik@mail.ru, n\_dudchik@tut.by; тел.: +375 (17) 284-13-85, 8 (029) 565-12-34).

Дроздова Елена Валентиновна – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией факторов среды обитания и технологий оценки риска здоровью (e-mail: drozdovaev@mail.ru; тел.: +375 (17) 284-13-86).

Сычик Сергей Иванович – кандидат медицинских наук, доцент, директор (e-mail: rspch@rspch.by; тел.: +375 (17) 284 -13-70).

терий, дрожжеподобных и плесневых грибов, вирусов), а также бактериальных биопленок [19–22]. Поэтому использование наноматериалов представляет значительный интерес для обеззараживания воды систем питьевого водоснабжения [23–28].

Однако экспериментальные данные об антимикробной активности наноматериалов имеют противоречивый и часто лишь качественный/полуколичественный характер. Разнообразие методических приемов моделирования, отсутствие стандартных протоколов испытаний для внедрения в практику аккредитованных лабораторий, а главное – отсутствие обоснованного критериального аппарата количественной оценки антимикробного действия наноматериалов не позволяют провести анализ массива экспериментальных данных в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики *GLP*, который предполагает строгое соблюдение протокола выполнения теста с оптимизированными условиями и параметрами для обеспечения получения сравнимых и достоверных данных [19, 29–32].

**Целью настоящей работы** было методологическое обоснование и разработка унифицированной и стандартизированной тест-модели, оптимизация параметров методики и обоснование критериального аппарата для количественной оценки антимикробной активности наноматериалов, применяемых в условиях водоочистки и водоподготовки, а также их апробация на инновационных наноматериалах.

**Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Музейные штаммы микроорганизмов обладали типичными морфологическими, культуральными и физиолого-биохимическими признаками соответствующих таксономических групп бактерий, а также хорошими ростовыми свойствами.

Для получения стандартизованных тест-моделей проводили культивирование в пробирках на 50 мл с 10 мл среды при температуре 35–37 °С в течение 18–24 часов до достижения стационарной фазы роста на оптимизированной среде следующего состава: мясопептонный бульон – 500 мл, глюкоза – 10,0 г; CaCO<sub>3</sub> – 1,0 г; MgSO<sub>4</sub> – 0,2 г; CaCl<sub>2</sub> – 0,02 г; FeCl<sub>3</sub> – 0,02 г; раствор микроэлементов 10%-ный – 0,01 мл на 1000,0 мл, pH 7,2–7,4. Готовили разведение суспензии тест-культуры по оптическому стандарту мутности Фарланда до рабочей концентрации клеток Log 2 КОЕ/мл в физиологическом растворе.

Для апробации разработанной методики использовали образцы на основе наноструктурированного диоксида титана (TiO<sub>2</sub>), нанесенного на различные подложки, полученные с использованием различных технологических приемов. Образцы любезно предоставлены профессором В.Е. Борисенко, научным руководителем Центра нанoeлектроники и новых материалов учреждения образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники», г. Минск.

**Дизайн модельного эксперимента.** Антимикробный потенциал образцов наноматериалов на основе диоксида титана (TiO<sub>2</sub>) изучали в условиях прямого контакта образцов со стандартизированной суспензией тест-культуры. В стерильный стеклянный стакан, содержащий 50 мл стандартизированной тест-культуры, помещали образцы наноматериалов размером 3,5×3,5 см<sup>2</sup>, экспонировали в течение 30 минут с одновременной активацией лампой видимого света Model: 01200100011 (EL-PL10PW, 50 Гц, 10 Ватт, тип G23D, color – purm white). Оценку численности популяции микроорганизмов после воздействия осуществляли методом посева 0,1–1,0 мл суспензии на поверхность дифференциально-диагностических питательных сред: Эндо для *E. coli*, желточно-солевого агара – для *S. aureus*. Посевы культивировали при оптимальной температуре 35–37 °С в течение 18–36 часов.

**Обработка результатов измерений.** Для количественной оценки после инкубирования подсчитывали типичные сформированные колонии на трех параллельных чашках Петри, содержащих не более 250 колоний. Рассчитывали количество микроорганизмов, КОЕ /мл, по формуле (1):

$$X = \frac{\tilde{N}}{V_1}, \quad (1)$$

где  $\tilde{N}$  – количество типичных колоний на чашке;  $V_1$  – объем посеянной пробы (0,1–1,0 мл).

За окончательный результат измерения принимали среднее арифметическое значение результатов пяти параллельных измерений.

Проверку приемлемости двух результатов единичных измерений, полученных в условиях повторяемости, осуществляли, рассчитывая абсолютное расхождение между десятичными логарифмами результатов единичных измерений, значение которого сравнивали со значением предела повторяемости ( $r$ ).

Если для значения абсолютного расхождения между десятичными логарифмами двух результатов единичных измерений выполнялось условие (2)

$$|\lg X_1 - \lg X_2| < r, \quad (2)$$

то оба результата единичных измерений считали приемлемыми.

Проверку дисперсий на однородность, статистические разбросы и выбросы выполняли по критерию Кохрена.

Расчет стандартного отклонения повторяемости проводили по формуле (3)

$$Sr = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (y_{i1} - y_{i2})^2}{2p}}. \quad (3)$$

Значение предела повторяемости  $r$  рассчитывали по формуле (4)

$$r = 2,8Sr. \quad (4)$$

Для количественной оценки антимикробного действия введен термин «антимикробный потенциал» и обоснован показатель  $R_{DDS}$ , рассчитываемый по формуле (5)

$$R_{DDS} = \frac{Lg_0 - Lg_{30}}{Lg_0}, \quad (5)$$

где  $Lg_0$  – десятичный логарифм численности популяции перед воздействием;

$Lg_{30}$  – десятичный логарифм численности популяции после 30 мин воздействия.

Для метрологической оценки методики рассчитывали стандартное отклонение повторяемости и предел повторяемости согласно требованиям законодательной метрологии<sup>1</sup>. При вычислениях исключали результаты подсчета с числом колоний более 250 КОЕ/чашку.

**Результаты и их обсуждение.** Статистические данные для оценки метрологических характеристик метода получены по результатам анализа образцов пяти серий измерений, выполненных в разное время в условиях повторяемости (таблица). В условиях разработанной стандартной методики и на основании критерия  $R_{DDS}$  был рассчитан антимикробный потенциал инновационных наноматериалов. Приме-

нена разработанная критериальная шкала оценки антимикробного потенциала материала:

$1,0 \geq R_{DDS} > 0,7$  – выраженный антимикробный потенциал;

$0,7 \geq R_{DDS} > 0,5$  – средний антимикробный потенциал;

$0,5 \geq R_{DDS} > 0,1$  – незначительный антимикробный потенциал;

$R_{DDS} \leq 0,1$  – отсутствие антимикробного потенциала.

Таким образом, хотя различная устойчивость представителей водной микробиоты к воздействию наноструктурированных материалов отмечена в работах ряда авторов [8, 18, 32–35], нами впервые количественно оценен антимикробный потенциал по критерию  $R_{DDS}$  [36–38].

Установлено, что в соответствии с предложенной критериальной шкалой антимикробное воздействие более выражено в отношении грамотрицательной микрофлоры, чем в отношении грамположительной. Выявлено также, что воздействие наноматериалов приводит к изменению фенотипических свойств, характерных для тест-культур. Тест-культура *Escherichia coli* ATCC 8739 изменяла тинкториальные свойства,

Результаты тестирования антимикробного потенциала  $R_{DDS}$  образцов наноматериалов\*

Образец	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739					<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				
	$Lg_0$	$X_{cp} \pm Sr$ $r$	$Lg_{30}$	$X_{cp} \pm Sr$ $r$	$R_{DDS}$	$Lg_0$	$X_{cp} \pm Sr$ $r$	$Lg_{30}$	$X_{cp} \pm Sr$ $r$	$R_{DDS}$
1	2,39	$2,35 \pm 0,058$ 0,162	0	$0 \pm 0,00$ 0,00	1,00 – выраженный	2,32	$2,32 \pm 0,029$	0,30	$0,18 \pm 0,16$ 0,448	0,92 – выраженный
	2,34		0			2,36		0,30		
	2,44		0			2,29		0,30		
	2,31		0			2,33		0,00		
	2,30		0			2,30		0,00		
2	2,39	$2,37 \pm 0,033$ 0,092	2,08	$2,09 \pm 0,067$ 0,188	0,12 – незначительный	2,32	$2,30 \pm 0,024$ 0,067	2,04	$2,15 \pm 0,098$ 0,274	0,07 – незначительный
	2,35		2,10			2,29		2,05		
	2,41		2,00			2,27		2,25		
	2,32		2,18			2,30		2,23		
	2,36		2,12			2,33		2,18		
3	2,38	$2,36 \pm 0,06$ 0,168	1,70	$1,65 \pm 0,134$ 0,375	0,30 – незначительный	2,35	$2,35 \pm 0,02$ 0,056	1,79	$1,75 \pm 0,05$ 0,018	0,25 – незначительный
	2,40		1,83			2,36		1,81		
	2,34		1,53			2,33		1,73		
	2,28		1,68			2,38		1,74		
	2,36		1,51			2,33		1,68		
4	2,34	$2,34 \pm 0,061$ 0,171	1	$0,82 \pm 0,117$ 0,328	0,65 – средний	2,29	$2,26 \pm 0,049$ 0,138	1,18	$1,01 \pm 0,11$ 0,308	0,55 – средний
	2,34		0,70			2,27		1,08		
	2,44		0,85			2,30		0,95		
	2,27		0,48			2,26		0,95		
	2,32		0,90			2,18		0,90		
5	2,38	$2,38 \pm 0,01$ 0,028	2,39	$2,37 \pm 0,05$ 0,14	0,003 – отсутствие	2,21	$2,26 \pm 0,11$ 0,308	2,22	$2,27 \pm 0,12$ 0,336	–0,002 – отсутствие
	2,38		2,34			2,23		2,24		
	2,38		2,44			2,12		2,11		
	2,37		2,31			2,37		2,37		
	2,36		2,36			2,38		2,39		

Примечание: – представлены данные в виде среднего пяти измерений;  $Sr$  – стандартное отклонение повторяемости;  $r$  – предел повторяемости.

<sup>1</sup> ГОСТ ИСО 5725-6-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 6. Использование значений точности на практике: Государственный стандарт Российской Федерации [Электронный ресурс]. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200029980> (дата обращения: 16.06.2018).

что приводило к вариабельности окраски по Граму, изменялась типичная форма вегетативных клеток и уменьшался их размер.

Впервые осуществлена метрологическая оценка операционных характеристик разработанного метода количественной оценки антимикробного потенциала наноматериалов. Рассчитаны показатели стандартного отклонения повторяемости ( $Sr$ ) и предела повторяемости ( $r$ ) с учетом приемлемости результатов единичных измерений, полученных в условиях повторяемости, проведена проверки дисперсий на однородность, статистические разбросы и выбросы, выполненная по критерию Кохрена.

**Выводы.** В ходе разработки методологии количественной оценки антимикробного потенциала наноматериалов обоснованы следующие стандартные условия проведения исследований и разработан стандартный протокол проведения испытаний:

1. Для моделирования реальных параметров водоподготовки тестирование должно проводиться в условиях прямого контакта наноматериалов с суспензией микроорганизмов в физиологическом растворе. Такой прием, в отличие от использования агаризованных пластин, обеспечивает однородное распределение активных компонентов в толще водных сред и позволяет избежать искажения результатов испытаний путем устранения эффектов экранирования тест-культур органическими компонентами питательных сред и способности наноматериала к диффузии в плотные среды.

2. Этапом оценки является экспозиция тест-культуры и образца наноматериала в условиях фотоактивации видимым светом в течение 30 минут. Предложенные условия являются достаточными для проявления антимикробных эффектов наноматериалов с различным, в том числе средним и слабым, потенциалом. С целью оценки динамики антимикробного эффекта может быть выбрана иная экспозиция.

3. Биологическими тест-моделями являются эпидемически значимые музейные штаммы *Escherichia coli* ATCC 8739 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, при этом *Escherichia coli* является палочковидной грамотрицательной бактерией, а *Staphylococcus aureus* – представитель кокковой грамположительной микрофлоры. Предложенные штаммы представлены в рутинной практике аккредитованных микробиологических лабораторий, так как являются стандартными для оценки активности дезинфектантов и антисептиков, для определения ростовых свойств питательных сред, в том числе в соответствии с международными стандартами.

4. Необходимой является строго стандартизованная подготовка музейных тест-культур для обес-

печения репрезентативных и воспроизводимых результатов, так как наибольший вклад в неопределенность при проведении тестирования вносит нестандартизованная тест-культура.

5. Целевая концентрация тест-культур должна быть подобрана таким образом, чтобы моделировать реальную микробную нагрузку в питьевой воде, составляющую 2 lg КОЕ/мл.

6. Рабочая поверхность образцов должна составлять  $3,5 \times 3,5$  см<sup>2</sup>, что является оптимальным параметром для выявления антимикробного потенциала.

7. Для количественной оценки антимикробного действия введен термин «антимикробный потенциал» и обоснован показатель  $R_{DDS}$ , рассчитываемый по формуле (5)

$$R_{DDS} = \frac{Lg_0 - Lg_{30}}{Lg_0},$$

где  $Lg_0$  – десятичный логарифм численности популяции перед воздействием;

$Lg_{30}$  – десятичный логарифм численности популяции после 30 мин воздействия.

8. В целях практического использования предложена критериальная шкала оценки:

$1,0 \geq R_{DDS} > 0,7$  – выраженный антимикробный потенциал;

$0,7 \geq R_{DDS} > 0,5$  – средний антимикробный потенциал;

$0,5 \geq R_{DDS} > 0,1$  – незначительный антимикробный потенциал;

$R_{DDS} \leq 0,1$  – отсутствие антимикробного потенциала.

При  $R_{DDS} = 1$  тестируемые наноматериалы проявляют максимально возможный антимикробный потенциал,  $R_{DDS} = 0$  – отсутствие антимикробного потенциала,  $R_{DDS} < -0,3$  – стимулирующая микроорганизмы активность.

Предложенные подходы и критериальная шкала могут быть широко применены в практике оценки антимикробной активности новых материалов, применяемых при водоподготовке и очистке питьевой воды.

Исследование выполнено при финансовой поддержке задания 3.05 «Исследовать свойства нанобиоструктурных сенсоров и носителей и провести оценку их биоактивности и цитотоксичности» ГПНИ «Конвергенция-2020» Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Хмельницкий И.К., Ларин А.В., Лучинин В.В. Современное состояние нормативно-методического обеспечения безопасности нанотехнологий в Российской Федерации // Биотехносфера. – 2015. – Т. 41, № 5. – С. 95–103.
2. Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Нанотехнологии в производстве пищевых продуктов: оценка рисков // Вопросы питания. – 2014. – Т. 83, № S3. – С. 174.

3. Развитие системы оценки безопасности и контроля наноматериалов и нанотехнологий в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, В.А. Тутельян, И.В. Гмошинский, С.А. Хотимченко // Гигиена и санитария. – 2013. – № 1. – С. 4–11.
4. Сравнительный анализ современных подходов к оценке рисков, создаваемых искусственными наночастицами и наноматериалами / А.А. Казак, Е.Г. Степанов, И.В. Гмошинский, С.А. Хотимченко // Вопросы питания. – 2012. – № 4. – С. 11–17.
5. Комплексная медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов: информационно-аналитическая и экспериментальная составляющие / В.А. Тутельян, С.А. Хотимченко, И.В. Гмошинский, А.А. Шумакова, Р.В. Распопов // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5. – С. 15–18.
6. Saad N.A., Jwad E.R. Investigation of addition titanium dioxide on general properties of polycarbonate // Open Access Library Journal. – 2018. – Vol. 5, № 1. – P. 1–11. DOI: 10.4236/oalib.1104229
7. Akhavan O. Lasting antibacterial activities of Ag-TiO<sub>2</sub>/Ag-a-TiO<sub>2</sub> nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation // J. Colloid Interface Sci. – 2009. – № 336. – P. 117–124. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.03.018
8. Nanostructured biomaterials with antimicrobial properties / Y.M. Sahin, M. Yetmez, F.N. Oktar, O. Gunduz, S. Agathopoulos, E. Andronescu, D. Ficai, M. Sonmez, A. Ficai // Curr. Med. Chem. – 2014. – Vol. 21, № 29. – P. 3391–3404.
9. Antibacterial and photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanomaterials in phosphate buffer and saline solution / A.M. Ng, C.M. Chan, M.Y. Guo, Y.H. Leung, A.B. Djuricic, X. Hu, W.K. Chan, F.C. Leung, S.Y. Tong // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 97, № 12. – P. 5565–5573. DOI: 10.1007/s00253-013-4889-4897
10. Catechol-functional chitosan/silver nanoparticle composite as a highly effective antibacterial agent with species-specific mechanisms / X. Huang, X. Bao, Y. Liu, Z. Wang, Q. Hu // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 12, № 7 (1). DOI: 10.1038/s41598-017-02008-4
11. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity / N. Duran, M. Duran, M.B. de Jesus, A.B. Seabra, W.J. Favaro, G. Nakazato // Nanomedicine. – 2016. – Vol. 3, № 12. – P. 789–99. DOI: 10.1016/j.nano.2015.11.016
12. Букина Ю.А., Сергеева Е.А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц и ионов серебра // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – № 14. – С. 170–171.
13. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents / G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morrelli, M. Galdiero // Molecules. – 2015. – Vol. 20, № 5. – P. 8856–8874. DOI: 10.3390/molecules20058856
14. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe *Pseudomonas putida* KT2440 / P. Gajjar, B. Pettee, D.W. Britt, W. Huang, W.P. Johnson, A.J. Anderson // J. of biological Engineering. – 2009. – Vol. 3, № 9. – P. 420–428. DOI: 10.1186/1754-1611-3-9.
15. Raghunath A., Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2017. – Vol. 49, № 2. – P. 137–152. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011
16. Existence, release, and antibacterial actions of silver nanoparticles on Ag-PIII TiO-films with different nanotopographies / J. Li, Y. Qiao, H. Zhu, F. Meng, X. Liu // Intern. J. of Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 3389–3402. DOI: 10.2147/IJN.S63807
17. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes / G.R. Rudramurthy, M.K. Swamy, U.R. Sinniah, A. Ghasemzadeh // Molecules. – 2016. – Vol. 21, № 7. – P. 836. DOI: 10.3390/molecules21070836
18. Биологическое действие наночастиц металлов и их оксидов на бактериальные клетки / И.А. Мамонова, И.В. Бабушкина, И.А. Норкин, Е.В. Гладкова, М.Д. Матасов, Д.М. Пучиньян // Российские нанотехнологии. – 2015. – Т. 10, № 1–2. – С. 106–110.
19. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery / L. Zhang, D. Pornpattananangku, C.M. Hu, C.M. Huang // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – № 17. – P. 585–594.
20. Grumezescu A.M., Chifiriuc C.M. Prevention of microbial biofilms – the contribution of micro and nanostructured materials // Curr. Med. Chem. – 2014. – Vol. 21, № 29. – P. 3311–3317.
21. Гладких П.Г. Эффект наночастиц серебра в отношении биопленок микроорганизмов (литературный обзор) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2015. – Т. 9, № 1. – С. 3–4.
22. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm / D. Wu, W. Fan, A. Kishen, J.L. Gutmann, B. Fan // J. Endod. – 2014. – Vol. 40, № 2. – P. 285–290. DOI: 10.1016/j.joen.2013.08.022
23. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications / Q. Li, S. Mahendra, D.Y. Lyon, L. Brunet, M.V. Liga, D. Li, P.J. Alvarez // Water research. – 2008. – Vol. 42, № 18. – P. 4591–4602. DOI: 10.1016/j.watres.2008.08.015
24. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review / M.N. Chong, B. Jin, C.W.K. Chow, C. Saint // Water Research. – 2010. – Vol. 44, № 10. – P. 2997–3027. DOI: 10.1016/j.watres.2010.02.039
25. Очистка поверхностных вод с использованием инновационных фильтрующих загрузок комплексного действия / Е.И. Тихомирова, Н.В. Веденева, О.В. Нечаева, Т.В. Анохина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Т. 18, № 2 (3). – С. 812–816.
26. Дроздова Е.В., Дудчик Н.В., Бурая В.В. Разработка методических подходов к оценке наноструктурированных материалов на основе диоксида титана для очистки воды от химических и биологических загрязнений // Роль и место гигиенической науки и практики в формировании здоровья нации: сборник тезисов межвузовской научно-практической конференции с международным участием. – М., 2014. – С. 76–78.
27. Инновационные методы очистки поверхностных и сточных вод с использованием наноструктурированных сорбентов / Н.В. Веденева, В.А. Заматырина, Е.И. Тихомирова, Т.В. Анохина, М.В. Истрашкина, С.В. Бобырев // Инновационная деятельность. – 2014. – Т. 2, № 1. – С. 26–32.
28. Антимикробные продукты нанотехнологий и дезинфекция водных сред (обзор) / К.А. Кыдралиева, В.А. Терехова, А.А. Порохов, Л.С. Кулябко, П.В. Учанов, Е.В. Федосеева, Р.А. James // Вода: химия и экология. – 2017. – № 10. – С. 45–55.
29. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria / E.D. Cavassin, L.F. de Figueiredo, J.P. Otoch, M.M. Seckler, R.A. de Oliveira, F.F. Franco, V.S. Marangoni, V. Zucolotto, A.S. Levin, S.F. Costa // J. Nanobiotechnology. – 2015. – Vol. 13, № 64. – DOI: 10.1186/s12951-015-0120-6
30. Фотокаталитическая инактивация популяций *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* под воздействием структурированных наноматериалов на основе диоксида титана / Н.В. Дудчик, С.И. Сычик, Е.В. Дроздова, О.В. Купреева // Донозологическая и здоровый образ жизни. – 2015. – Т. 16, № 1. – С. 28–31.

31. In Vitro antibacterial activity of nanomaterial for using in tobacco plants tissue culture / K. Safavi, F. Mortazaeinezhad, M. Esfahanizadeh, M.J. Asgari // World Academy of Science, Engineering and Technology (Conference Paper). – 2011. – № 55. – P. 372–373. DOI: 10.13140/2.1.1236.8007
32. Биологическая активность ионов, нано- и микрочастиц Cu и Fe в тесте ингибирования бактериальной биоломинесценции / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, Т.Д. Дерябина, Л.В. Ефремова // Нанотехнологии: разработка, применение – XXI век. – 2012. – Т. 4, № 1. – С. 28–33.
33. Antimicrobial applications of water-dispersible magnetic nanoparticles in biomedicine / K.S. Huang, D.B. Shieh, C.S. Yeh, P.C. Wu, F.Y. Cheng // Curr. Med. Chem. – 2014. – Vol. 21, № 29. – P. 3312–3322.
34. Rizzello L., Cingolani R., Pompa P.P. Nanotechnology tools for antibacterial materials // Nanomedicine (Lond). – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. 807–821. DOI: 10.2217/nnm.13.63
35. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future // Int. J. Nanomedicine. – 2017. – Vol. 14, № 12. – P. 1227–1249. DOI: 10.2147/IJN.S121956
36. Дудчик Н.В., Дроздова Е.В., Сычик С.И. Альтернативные биологические тест-модели в оценке риска воздействия факторов среды обитания. – Минск: Белорусский научно-исследовательский институт транспорта «Транстехника», 2015. – 194 с.
37. Дудчик Н.В., Шевляков В.В. Прокариотические тест-модели для оценки биологического действия и гигиенической регламентации факторов окружающей среды // Современные методологические проблемы изучения, оценки и регламентирования факторов окружающей среды, влияющих на здоровье человека: материалы международного форума научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды, посвященного 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сытина» Минздрава России 15–16 декабря 2016 г. / под ред. Ю.А. Рахманина. – М., 2016. – Т. 1. – С. 167–189.
38. Мельникова Л.А., Дудчик Н.В., Коломиец Н.Д. Изучение эффективности различных методов дезобработки // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2003. – № 8. – С. 98–99.

*Дудчик Н.В., Дроздова Е.В., Сычик С.И. Тест-модель и количественный критериальный показатель для оценки антимикробного потенциала наноматериалов, используемых для водоочистки и водоподготовки: обоснование и метрологическая оценка // Анализ риска здоровью. – 2018. – № 3. – С. 104–111. DOI: 10.21668/health.risk/2018.3.11*

UDC 628.19: [579.66: 620.3]  
DOI: 10.21668/health.risk/2018.3.11.eng

Read  
online 

## TEST-MODEL AND QUANTITATIVE $R_{DDS}$ CRITERION INDEX WHICH ARE APPLIED TO ESTIMATE ANTIMICROBIC POTENTIAL OF NANOMATERIALS USED FOR WATER PURIFICATION AND TREATMENT: SUBSTANTIATION AND METROLOGIC ASSESSMENT

**N.V. Dudchik, E.V. Drozdova, S.I. Sychik**

Scientific-practical Hygiene Center, 8 Akademicheskaya Str., Minsk, 220012, Republic of Belarus

*To reduce population health risks which occur when people consume drinking water from centralized water supply systems is a vital medical-biologic and technical problem. It can be solved, among other things, via development and application of new materials for water purification and treatment. Some natural and artificial nanomaterials have antimicrobial properties as they can eliminate microorganisms of various taxonomy (bacteria, yeast-like and mold fungi) and bacterial biofilms. However, certain results which were obtained when antimicrobial potential of nanomaterials was estimated are controversial; they are frequently only qualitative or semi-quantitative due to absence of a standard test protocol and well-grounded criterial assessment apparatus. So, the goal of this paper was to give methodological grounds and to create a unified and standardized test-model; to optimize parameters of a procedure and to substantiate a system of criteria applied for quantitative assessment of antimicrobial activity which is characteristic for nanomaterials applied for water purification and treatment.*

© Dudchik N.V., Drozdova E.V., Sychik S.I., 2018

**Natal'ya V. Dudchik** – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Microbiology Laboratory (e-mail: n\_dudchik@mail.ru, n\_dudchik@tut.by; tel.: +375 (17) 284-13-85, +7 (029) 565-12-34).

**Elena V. Drozdova** – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of Laboratory for Environmental Factors and Health Risk Assessment Technologies (e-mail: drozdovaev@mail.ru; tel.: +375 (17) 284-13-86).

**Sergei I. Sychik** – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Director (e-mail: rspch@rspch.by; tel.: +375 (17) 284-13-70).

The research was performed on the following objects: samples of nanomaterials based on titanium dioxide which were applied for water purification and treatment. The authors have substantiated a test-model, suggested a criterion index  $R_{DDS}$ , made up a standard test protocol for quantitative assessment of antimicrobial potential possessed by nanomaterials.

The developed technology has been tested on samples of nanomaterials based on titanium dioxide. We have calculated and assessed metrological parameters of the procedure (repeatability standard deviation and repeatability limit) which conform to the requirements existing for similar procedures when confidence probability is assumed to be equal to 95 %; such requirements are fixed by the ISO (International Standardization Organization) and correspond to the GLP (Good Laboratory Practice) principles. The relevance of the test-model was validated; this relevance provides an objective quantitative assessment of antimicrobial potential which is possessed by materials applied for disinfection of water objects contaminated with microbiota of various taxonomy, as well as for control and prevention of bacterial infections which can be communicated with water.

**Key words:** nanomaterials, test-model, antimicrobial potential, quantitative criterion index  $R_{DDS}$ , metrological assessment.

## References

1. Khmel'nitskii I.K., Larin A.V., Luchinin V.V. Sovremennoe sostoyanie normativno-metodicheskogo obespecheniya bezopasnosti nanotekhnologii v Rossiiskoi Federatsii [The current state of regulatory and methodical support of nanotechnology safety in the Russian Federation]. *Biotehnosfera*, 2015, vol. 41, no. 5, pp. 95–103 (in Russian).
2. Gmshinskii I.V., Khotimchenko S.A. Nanotekhnologii v proizvodstve pishchevykh produktov: otsenka riskov [Nanotechnology applied in food products manufacturing: risk assessment]. *Voprosy pitaniya*, 2014, vol. 83, no. S3, pp. 174 (in Russian).
3. Onishchenko G.G., Tutel'yan V.A., Gmshinskii I.V., Khotimchenko S.A. Razvitiye sistemy otsenki bezopasnosti i kontrolya nanomaterialov i nanotekhnologii v Rossiiskoi Federatsii [Development of the system for nanomaterials and nanotechnology safety in Russian Federation]. *Gigiena i sanitariya*, 2013, № 1, pp. 4–11 (in Russian).
4. Kazak A.A., Stepanov E.G., Gmshinskii I.V., Khotimchenko S.A. Sravnitel'nyi analiz sovremennykh podkhodov k otsenke riskov, sozdavaemykh iskusstvennymi nanochastitsami i nanomaterialami [Comparative analysis of modern approaches to risk estimation from artificially created nanoparticles and nanomaterials]. *Voprosy pitaniya*, 2012, no. 4, pp. 11–17 (in Russian).
5. Tutel'yan V.A., Khotimchenko S.A., Gmshinskii I.V., Shumakova A.A., Raspopov R.V. Kompleksnaya mediko-biologicheskaya otsenka bezopasnosti nanomaterialov: informatsionno-analiticheskaya i eksperimental'naya sostavlyayushchie [Comprehensive medical-biological evaluation of nanomaterials safety: communicatory-analytical and experimental constituents]. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*, 2011, no. 5, pp. 15–18 (in Russian).
6. Saad N.A., Jwad E.R. Investigation of addition titanium dioxide on general properties of polycarbonate. *Open Access Library Journal*, 2018, vol. 5, no. 1, pp. 1–11. DOI: 10.4236/oalib.1104229
7. Akhavan O. Lasting antibacterial activities of Ag-TiO<sub>2</sub>/Ag/a-TiO<sub>2</sub> nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation. *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, no. 336, pp. 117–124. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.03.018
8. Sahin Y.M., Yetmez M., Oktar F.N., Gunduz O., Agathopoulos S., Andronescu E., Ficaï D., Sonmez M., Ficaï A. Nanostructured biomaterials with antimicrobial properties. *Curr. Med. Chem.*, 2014, vol. 21, no. 29, pp. 3391–3404.
9. Ng A.M., Chan C.M., Guo M.Y., Leung Y.H., Djuricic A.B., Hu X., Chan W.K., Leung F.C., Tong S.Y. Antibacterial and photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanomaterials in phosphate buffer and saline solution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, vol. 97, no. 12, pp. 5565–5573. DOI: 10.1007/s00253-013-4889-4897
10. Huang X., Bao X., Liu Y., Wang Z., Hu Q. Catechol-functional chitosan/silver nanoparticle composite as a highly effective antibacterial agent with species-specific mechanisms. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 12, no. 7 (1). DOI: 10.1038/s41598-017-02008-4
11. Duran N., Duran M., de Jesus M.B., Seabra A.B., Favaro W.J., Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*, 2016, no. 12 (3), pp. 789–99. DOI: 10.1016/j.nano.2015.11.016
12. Bukina Yu.A., Sergeeva E.A. Antibakterial'nye svoystva i mekhanizm bakteritsidnogo deystviya nanochastits i ionov serebra [Antibacterial properties and bactericidal effects exerted by silver nanoparticles and ions]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2012, no. 14, pp. 170–171 (in Russian).
13. Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. 2015, vol. 20, no. 5, pp. 8856–8874. DOI: 10.3390/molecules20058856
14. Gajjar P., Pettee B., Britt D.W., Huang W., Johnson W.P., Anderson A.J. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe *Pseudomonas putida* KT2440. *J. of biological Engineering*, 2009, vol. 3, no. 9, pp. 420–428. DOI: 10.1186/1754-1611-3-9
15. Raghunath A., Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2017, vol. 49, no. 2, pp. 137–152. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011
16. Li J., Qiao Y., Zhu H., Meng F., Liu X. Existence, release, and antibacterial actions of silver nanoparticles on Ag-PIII TiO<sub>2</sub> films with different nanotopographies. *Intern. J. of Nanomedicine*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 3389–3402. DOI: 10.2147/IJN.S63807
17. Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R., Ghasemzadeh A. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules*, 2016, vol. 21, no. 7, pp. 836. DOI: 10.3390/molecules21070836
18. Mamonova I.A., Babushkina I.V., Norkin I.A., Gladkova E.V., Matasov M.D., Puchin'yan D.M. Biologicheskoe deystvie nanochastits metallov i ikh oksidov na bakterial'nye kletki [Biological activity of metal nanoparticles and their oxides and their effect on bacterial cells]. *Rossiiskie nanotekhnologii*, 2015, vol. 10, no. 1–2, pp. 106–110 (in Russian).
19. Zhang L., Pornpattananangku D., Hu C.M., Huang C.M. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, no. 17, pp. 585–594.
20. Grumezescu A.M., Chifiriuc C.M. Prevention of microbial biofilms - the contribution of micro and nanostructured materials. *Curr. Med. Chem.*, 2014, vol. 21, no. 29, pp. 3311–3317.
21. Gladkikh P.G. Effekt nanochastits serebra v otnoshenii bioplenok mikroorganizmov (literaturnyi obzor) [Effects exerted by silver nanoparticles on biofilms made up of microorganisms (literature review)]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii. Elektronnoe izdanie*, 2015, vol. 9, no. 1, pp. 3–4 (in Russian).

22. Wu D., Fan W., Kishen A., Gutmann J.L., Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J. Endod.*, 2014, vol. 40, no. 2, pp. 285–290. DOI: 10.1016/j.joen.2013.08.022
23. Li Q., Mahendra S., Lyon D.Y., Brunet L., Liga M.V., Li D., Alvarez P.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water research*, 2008, vol. 42, no. 18, pp. 4591–4602. DOI: 10.1016/j.watres.2008.08.015
24. Chong M.N., Jin B., Chow C.W.K., Saint C. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Water Research*, 2010, vol. 44, no. 10, pp. 2997–3027. DOI: 10.1016/j.watres.2010.02.039
25. Tikhomirova E.I., Vedeneeva N.V., Nechaeva O.V., Anokhina T.V. Ochistka poverkhnostnykh vod s ispol'zovaniem innovatsionnykh fil'truyushchikh zagruzok kompleksnogo deistviya [Purification the surface waters with using the innovative complex action filters]. *Izvestiya Samarского nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*, 2016, vol. 18, no. 2 (3), pp. 812–816 (in Russian).
26. Drozdova E.V., Dudchik N.V., Buraya V.V. Razrabotka metodicheskikh podkhodov k otsenke nanostrukturirovannykh materialov na osnove dioksida titana dlya ochistki vody ot khimicheskikh i biologicheskikh zagryaznenii [Development of methodological approaches to assessment of nano-structured materials based on titanium dioxide and applied for water purification from chemical and biological contamination]. *Rol' i mesto gigienicheskoi nauki i praktiki v formirovaniy zdorov'ya natsii: sbornik tezisev mezhdunarodskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem [Role played and place occupied by hygienic science and practices in creation of a nation's health: a collection of theses issued at an interuniversity theoretical and practical conference with international participation]*. Moscow, 2014, pp. 76–78 (in Russian).
27. Vedeneeva N.V., Zamatyrina V.A., Tikhomirova E.I., Anokhina T.V., Istrashkina M.V., Bobyrev S.V. Innovatsionnye metody ochistki poverkhnostnykh i stochnykh vod s ispol'zovaniem nanostrukturirovannykh sorbentov [Innovative methods for cleaning the surface and waste water using nanostructured sorbents]. *Innovatsionnaya deyatel'nost'*, 2014, vol. 2, no. 1, pp. 26–32 (in Russian).
28. Kydraliev K.A., Terekhova V.A., Poromov A.A., Kulyabko L.S., Uchanov P.V., Fedoseeva E.V., James R.A. Antimikrobnnye produkty nanotekhnologii i dezinfektsiya vodnykh sred (obzor) [Antimicrobial products of nanotechnologies and disinfection of water environments (review)]. *Voda: khimiya i ekologiya*, 2017, no. 10, pp. 45–55 (in Russian).
29. Cavassin E.D., de Figueiredo L.F., Otoch J.P., Seckler M.M., de Oliveira R.A., Franco F.F., Marangoni V.S., Zucolotto V., Levin A.S., Costa S.F. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J. Nanobiotechnology*, 2015, vol. 13, no. 64. Available at: <https://jnanobiotechnology.biomed-central.com/articles/10.1186/s12951-015-0120-6> (16.06.2018).
30. Dudchik N.V., Sychik S.I., Drozdova E.V., Kupreeva O.V. Fotokataliticheskaya inaktivatsiya populyatsii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* pod vozdeistviem strukturirovannykh nanomaterialov na osnove dioksida titana [Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* populations under exposure to structured nanomaterials based on titanium dioxide]. *Donozologiya i zdorovyi obraz zhizni*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 28–31. (in Russian).
31. Safavi K., Mortazaeinezhad F., Esfahanizadeh M., Asgari M.J. In Vitro antibacterial activity of nanomaterial for using in tobacco plants tissue culture. *World Academy of Science, Engineering and Technology (Conference Paper)*, 2011, no. 55, pp. 372–373. DOI: 10.13140/2.1.1236.8007
32. Deryabin D.G., Aleshina E.S., Deryabina T.D., Efremova L.V. Biologicheskaya aktivnost' ionov, nano- i mikrochastits Cu i Fe v teste ingibirovaniya bakterial'noi bioluminesentsii [Biological Activity of Ions, Nano- and Micro-Sized Cu and Fe Particles Determined with a Bioluminescence Inhibition Assay]. *Nanotekhnologii: razrabotka, primeneniye – XXI vek*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 28–33 (in Russian).
33. Huang K.S., Shieh D.B., Yeh C.S., Wu P.C., Cheng F.Y. Antimicrobial applications of water-dispersible magnetic nanoparticles in biomedicine. *Curr. Med. Chem.*, 2014, vol. 21, no. 29, pp. 3312–3322.
34. Rizzello L., Cingolani R., Pompa P.P. Nanotechnology tools for antibacterial materials. *Nanomedicine (Lond)*, 2013, vol. 8, no. 5, pp. 807–821. DOI: 10.2217/nnm.13.63
35. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomedicine*, 2017, vol. 14, no. 12, pp. 1227–1249. DOI: 10.2147/IJN.S121956
36. Dudchik N.V., Drozdova E.V., Sychik S.I. Al'ternativnye biologicheskie test-modeli v otsenke riska vozdeistviya faktorov srede obitaniya [Alternative biological test models for risk assessment of environmental factors]. Minsk, Belorusskii nauchno-issledovatel'skii institut transporta «Transtekhnika» Publ., 2015, 194 p. (in Russian).
37. Dudchik N.V., Shevlyakov V.V. Prokarioticheskie test-modeli dlya otsenki biologicheskogo deistviya i gigienicheskoi reglamentatsii faktorov okruzhayushchei srede [Prokaryotic test-models for assessing biological effects and hygienic standardization of environmental factors]. *Sovremennye metodologicheskie problemy izucheniya, otsenki i reglamentirovaniya faktorov okruzhayushchei srede, vliyayushchikh na zdorov'e cheloveka: materialy mezhdunarodnogo Foruma nauchnogo sojeta Rossiiskoi Federatsii po ekologii cheloveka i gigiene okruzhayushchei srede [Contemporary methodological issues related to examination, assessment, and standardization of environmental factors which influence people's health: materials of the international Conference held by the RF scientific council on human ecology and environmental hygiene]*. In: Yu.A. Rakhmanin ed. Moscow, 2016, vol. 1, pp. 167–189 (in Russian).
38. Mel'nikova L.A., Dudchik N.V., Kolomiets N.D. Izuchenie effektivnosti razlichnykh metodov dezobrabotki [Research on efficiency of various disinfection techniques] *Khraneniye i pererabotka sel'khoz'syr'ya*, 2003, no. 8, pp. 98–99 (in Russian).

*Dudchik N.V., Drozdova E.V., Sychik S.I. Test-model and quantitative  $R_{DD5}$  criterion index which are applied to estimate antimicrobial potential of nanomaterials used for water purification and treatment: substantiation and metrologic assessment. Health Risk Analysis, 2018, no. 3, pp. 104–111. DOI: 10.21668/health.risk/2018.3.11.eng*

Получена: 27.08.2018

Принята: 06.09.2018

Опубликована: 30.09.2018