

УДК 57+66.085.3

## ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ $TiO_2$ -ПЛЕНОК

© 2011 г. С. Н. Плескова\*, И. С. Голубева\*, Ю. К. Верёвкин\*\*, Е. А. Першин\*, В. Н. Буренина\*\*, В. В. Королихин\*\*

\*Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, Нижний Новгород, 603155  
e-mail: pleskova@mail.ru

\*\*Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, 603150

Поступила в редакцию 22.09.2009 г.

Продемонстрировано снижение числа КОЕ грамположительных и грамотрицательных бактерий при инкубации их на поверхности  $TiO_2$ -пленок, облученных УФ-светом (380 нм). Отмечено снижение жизнеспособности бактерий после 15-минутной экспозиции для *Staphylococcus aureus* на 29%, для *Staphylococcus epidermidis* – на 45%, для *Escherichia coli* – на 47%. Впервые выявлено, что повторное использование  $TiO_2$ -пленок для тестирования жизнеспособности бактериальной суспензии, приводит к потере УФ-индуцированной бактерицидной активности. Однако отжиг  $TiO_2$ -пленок при температуре свыше 400°C вызывает восстановление фотоиндуцированной биоцидности до исходного уровня.

Важной задачей прикладной микробиологии является создание и исследование “самостерилизующихся” поверхностей, т.е. тех, на которых происходит инактивация и уничтожение бактерий, разложение органических загрязнений и т.д. [1]. В разработке антимикробных покрытий активно используется явление фотокатализа, где в качестве дезинфицирующего начала выступают активные формы кислорода: супероксид анион-радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксил-радикал ( $OH^{\bullet}$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), выделяемые с поверхности нанопленок. Обладающие такими свойствами поверхности могут быть использованы для решения экологических проблем (фотокаталитическая очистка воздуха, питьевой и промышленных сточных вод), в решении проблем, связанных с созданием высококачественных помещений (операционные, лаборатории), в применении упаковки и консервирования пищевых продуктов [2]. Для покрытия поверхностей с целью придания им требуемых свойств лучше всего подходят  $TiO_2$ -пленки [3]. Золь-гель-технология позволяет нанести  $TiO_2$ -пленки заданной структуры и свойств практически на любые поверхности [4]. В статье Армеало Л. и соавт. [5] приводятся сведения о подавлении роста бактерий в результате пребывания их на поверхности  $TiO_2$ -пленок, в которых под действием ультрафиолета индуцируется образование активных форм кислорода. Однако в данном исследовании зарегистрирована УФ-индуцированная бактерицидная активность  $TiO_2$ -пленок только для одного штамма. Существенным недостатком работы следует считать

и отсутствие сведений о воспроизводимости результатов при многократном использовании пленок.

Цель работы – определение бактерицидных свойств  $TiO_2$ -пленок под действием УФ (380 нм) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и определение условий, в которых реализуется это свойство.

### МЕТОДИКА

Исследуемыми объектами были штаммы: золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus* 956), эпидермальный стафилококк (*S. epidermidis* 1061), кишечная палочка (*Escherichia coli* 321-5). Культуры выделены на базе бактериологической лаборатории клинической инфекционной больницы № 2 – г. Нижнего Новгорода.

**Получение  $TiO_2$ -пленок.**  $TiO_2$ -пленки наносили на поверхность стекла химическим методом из растворов гидролизующихся соединений (золь-гель-технология). В качестве пленкообразующего вещества использовали 5%-ный тетрабутоксититан  $Ti(OC_4H_9)_4$  в изопропиловом спирте. Катализатор и стабилизатор – соляная кислота. Раствор наносили на поверхность вращающейся чашки Петри. На стекле появлялся однородный по толщине прозрачный слой полимеризованной титановой кислоты. Последующая термическая обработка (400°C, 5 ч) приводила к завершению реакций разложения промежуточных продуктов гидролиза и к полному удалению растворителя. После испарения остается прозрачная пленка  $TiO_2$ , прочно связанная с поверхностью стекла [6, 7].

**Таблица 1.** Число КОЕ бактерий после инкубации их под ультрафиолетовым светом (380 нм) в течение 15 мин на поверхности стекла (контроль) и стекла, покрытого TiO<sub>2</sub>-пленками (опыт)\*

Штамм	Поверхность стекла (контроль)	Поверхность TiO <sub>2</sub> -пленок (опыт)
<i>S. aureus</i> 956	115.8 ± 10.7	82.5 ± 6.5
<i>S. epidermidis</i> 1061	153.2 ± 24.6	84.0 ± 17.0
<i>E. coli</i> 321-5	279.0 ± 34.5	148.3 ± 27.8

\* Различия между контролем и опытом статистически значимы ( $p < 0.05$ ).

**Получение бактериальной суспензии.** Штаммы выращивали на ГМФ-агаре (ЗАО “НИЦ фармакотерапии”, Санкт-Петербург) 20 ч при 37°C. Со скошенного агара делали смыв стерильным физиологическим раствором (ОАО “Биохимик”, г. Саранск), дважды отмывали физиологическим раствором (рН 7.2) и доводили коэффициент поглощения микробной суспензии до 0.269 на КФК-2МП (Россия) (670 нм). Это соответствовало 10 МЕ стандарта мутности. Из полученной суспензии готовили серию разведений, для того чтобы добиться получения на ГМФ-агаре роста изолированных колоний в количестве около 200 КОЕ. В сериях предварительных экспериментов это разведение составило для: *S. aureus* 956 – 1 : 200000, *S. epidermidis* 1061 – 1 : 100000, *E. coli* 321-5 – 1 : 200000. Каждое разведение тестировали на поверхности TiO<sub>2</sub>-пленок.

**Исследование бактерицидной активности TiO<sub>2</sub>-пленок.** В эксперименте нанесенную на TiO<sub>2</sub>-пленки бактериальную суспензию облучали УФ-светом (380 нм) 15 мин. Плотность мощности светопотока УФ-лампы (ВИО-2, Украина), оцененная измерителем энергии излучения (ИМО-2Н, Россия) составила 4.5 мВт/см<sup>2</sup>. Для отсечения “короткого” ультрафиолета, обладающего собственной бактери-

цидной активностью ( $\lambda < 365$  нм) использовали светофильтр УФС-6. В положительном контрольном эксперименте в тех же условиях облучали бактериальную суспензию, нанесенную на поверхность стерильного стекла. В дальнейшем снижение жизнеспособности бактерий на поверхности TiO<sub>2</sub>-пленок оценивали относительно этого контроля. В отрицательном контроле бактериальную суспензию инкубировали как на поверхности TiO<sub>2</sub>-пленок, так и без нее (поверхность стекла), в темноте. Поскольку отрицательный контроль демонстрировал отсутствие различий в образовании КОЕ у бактерий, инкубированных как на поверхности TiO<sub>2</sub>-пленок, так и на поверхности стекла, он был использован только в первых сериях экспериментов, а в дальнейшем был исключен. После инкубации под УФ-светом в течение 15 мин бактериальную суспензию стерильно, дозатором (0.05 мл) переносили на поверхность ГМФ-агара в чашки Петри и шпателем равномерно распределяли суспензию. Посевы инкубировали 20 ч при 37°C, после чего производился подсчет КОЕ.

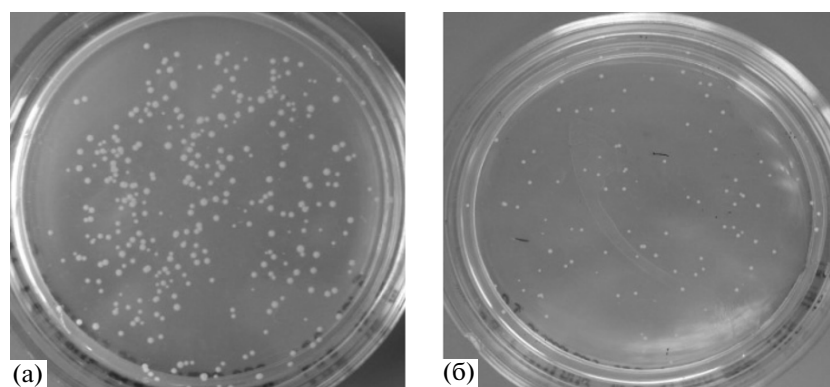
**Статистическая обработка.** Проводилась в пакете Origin 7.0 Server. Определяли значения средних и среднее квадратичное отклонение. Для анализа статистически значимых различий двух выборок использовали критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование УФ-индуцированной бактерицидности TiO<sub>2</sub>-пленок показало существенное снижение жизнеспособности как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (табл. 1).

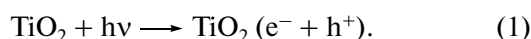
Особенно существенное снижение жизнеспособности в результате пребывания на поверхности УФ-активированных TiO<sub>2</sub>-пленок отмечено для грамотрицательных бактерий (*E. coli* 321-5): число КОЕ снизилось практически в 2 раза (рис. 1).

Согласно данным литературы, снижение числа КОЕ, вероятнее всего, происходит в результате



**Рис. 1.** Снижение числа КОЕ штамма *E. coli* 321-5 после инкубации в течение 15 мин на поверхности TiO<sub>2</sub>-пленок: а – контроль (инкубация под УФ-светом без TiO<sub>2</sub>-пленки); б – опыт (инкубация под УФ-светом на поверхности TiO<sub>2</sub>-пленок).

гибели бактерий, обусловленной нарушением целостности клеточной стенки. Такое явление наблюдается вследствие окисления клеточной стенки активными формами кислорода, образуемыми на поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленок [5]. Для начального звена, генерирующего запуск цепной реакции по образованию активных форм кислорода необходима энергия, превышающая величину запрещенной зоны  $\text{TiO}_2$ . В наших экспериментах – кванты света с  $\lambda < 390$  нм. Согласно исследованиям Лынькова Л.М. и соавт. [8], при поглощении кванта света в пленке  $\text{TiO}_2$  формируются межзельные центры  $\text{Ti}^{3+}$  (дырки), свободные гидроксильные радикалы ( $\text{OH}^\bullet$ ) и супероксид анион-радикалы ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Разделение зарядов в  $\text{TiO}_2$ -пленках с формированием электронов ( $e^-$ ) и дырок ( $h^+$ ) происходит по следующему механизму:



Формирование активных форм кислорода Лыньков и соавт. доказали методом ЭПР [8]. Активные формы кислорода окисляют не только основные структуры бактериальных мембран и клеточных стенок, но и модифицируют азотистые основания ДНК, вызывая разрывы молекулы и инактивируют основные группы бактериальных ферментов [9, 10]. Сочетание различных механизмов биоцидности АФК приводило к значительному снижению жизнеспособности бактерий в наших экспериментах.

Однако исследование воспроизводимости результатов при повторном использовании  $\text{TiO}_2$ -пленок привело к неожиданному результату. После отмывания пленок от бактериальной суспензии и их последующей стерилизации ( $180^\circ\text{C}$ , 60 мин) они не проявляли фотокаталитической и бактерицидной активности (табл. 2). Увеличение времени экспозиции бактериальной суспензии под УФ-светом до 30 мин также не приводило к реверсии фотоиндуцированной бактерицидности  $\text{TiO}_2$ -пленок.

Объяснением наблюдаемых результатов может являться феномен супергидрофильности: дырка, образуемая в результате отрыва электрона, реагирует с водой, вследствие чего поверхность  $\text{TiO}_2$ -пленки становится гидрофильной (рис. 2) [3]. Реализа-

**Таблица 2.** Число КОЕ бактерий после инкубации под ультрафиолетовом светом (380 нм) в течение 30 мин на поверхности стекла (контроль) и стекла, покрытого повторно используемыми  $\text{TiO}_2$ -пленками (опыт)\*

Штамм	Поверхность стекла (контроль)	Поверхность повторно используемых $\text{TiO}_2$ -пленок (опыт)
<i>S. aureus</i> 956	$459.2 \pm 23.8$	$425.0 \pm 46.7$
<i>S. epidermidis</i> 1061	$536.3 \pm 37.1$	$521.0 \pm 90.7$
<i>E. coli</i> 321-5	$162.2 \pm 33.4$	$126.4 \pm 18.5$

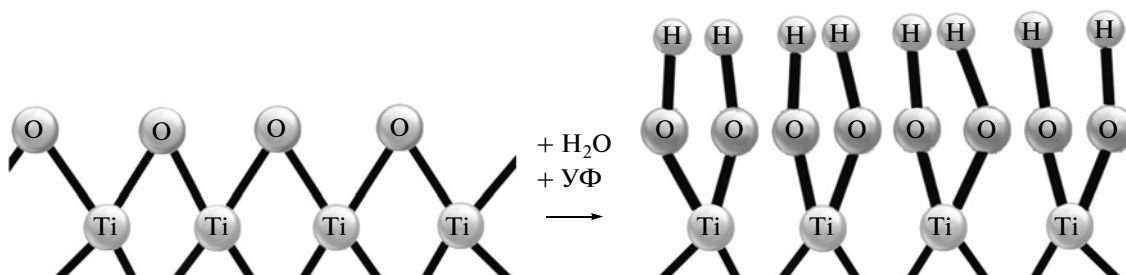
\* Статистически значимые различия не обнаружены ни в одном из опытов ( $p > 0.05$ ).

ция феномена супергидрофильности высоковероятна и в серии наших экспериментов, поскольку мы наносили на поверхность  $\text{TiO}_2$ -пленок водные бактериальные суспензии.

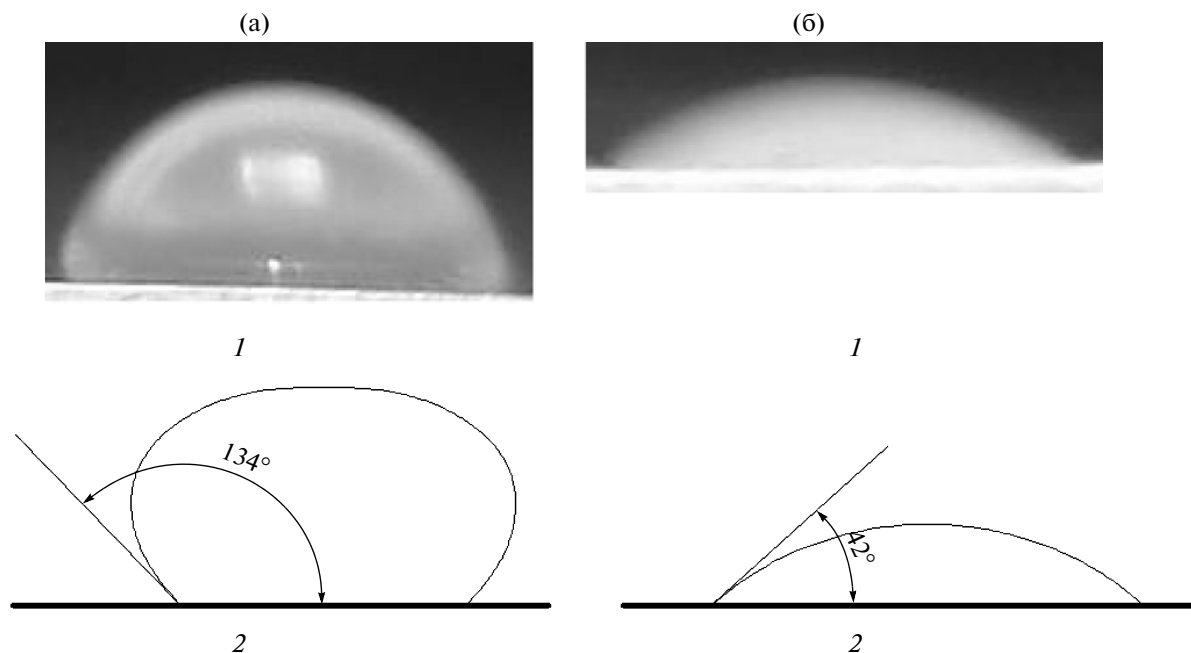
Для доказательства факта изменения свойств поверхности с гидрофобных (исходная пленка) на гидрофильные (повторно используемая пленка) после облучения УФ-светом в присутствии жидкости проводили опыты с каплей дистиллированной воды. Капля воды на поверхности первично нанесенных  $\text{TiO}_2$ -пленок проявляет достаточно выраженную гидрофобность поверхности первично нанесенных  $\text{TiO}_2$ -пленок (рис. 3), поскольку краевой угол составляет  $134^\circ$ . После облучения капли УФ-светом (380 нм) она растекалась по поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленки, что проявлялось в снижении краевого угла до  $42^\circ$ .

Таким образом, на поверхности первично нанесенных  $\text{TiO}_2$ -пленок протекает параллельно два фотохимических процесса: образование активных форм кислорода и гидрофилизация поверхности. При повторном использовании пленок гидроксилированная поверхность полностью утрачивает фотокаталитическую активность, поскольку не способна больше быть донором электронов.

Были предприняты попытки реверсии свойства фотоиндуцированной бактерицидной активности  $\text{TiO}_2$ -пленок. Для этого необходимо было избавиться от гидроксильных радикалов на поверхности пленки. Это достигалось повторным отжигом  $\text{TiO}_2$ -



**Рис. 2.** Схема гидрофилизации  $\text{TiO}_2$ -пленки под действием УФ-света: О – кислород; Ti – титан; Н – водород.



**Рис. 3.** Изменение свойств поверхности с гидрофобных (а) на гидрофильные (б) после облучения TiO<sub>2</sub>-пленок УФ-светом (380 нм) в течение 5 мин: 1 – микрофотография капли на поверхности TiO<sub>2</sub>-пленки; 2 – схематическое изображение капли с измерением угла наклона.

пленок при 400°C в течение 5 ч. Проведенные эксперименты показали практически полное восстановление изначальных свойств TiO<sub>2</sub>-пленок (табл. 3).

Для исключения возможности влияния на жизнеспособность бактериальных клеток изменяющегося pH среды проводили измерение кислотности бактериальной суспензии перед нанесением на поверхность TiO<sub>2</sub>-пленок и после 15-минутной инкубации под действием ультрафиолета. Водородный потенциал не изменялся и в обоих случаях равнялся 7.0. Следовательно, влияния pH на бактериальные штаммы в данных экспериментах не обнаружено.

Таким образом, в представленной работе зафиксирована УФ-индуцированная бактерицидная активность одного из классов наноматериалов – TiO<sub>2</sub>-

пленок в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Однако при исследовании бактериальных суспензий, взвешенных в жидкостях (физиологический раствор), стерилизующая активность проявлялась лишь при однократном использовании, поскольку под действием УФ-излучения происходило изменение свойств самой поверхности. Она становится гидрофильной, о чем свидетельствует изменение краевого угла тестируемой капли в 3 раза. Свойство гидрофильности поверхности многими авторами расценивается как позитивное, поскольку с гидрофилизированных поверхностей происходит механический смыл различного рода микроорганизмов и других органических загрязнений. Но если это свойство поверхности может удовлетворять строительную и автомобилестроительную отрасли, то для медицинской, пищевой и экологической микробиологии его недостаточно, поскольку первостепенной задачей этих областей исследования является не механическое удаление, а полное уничтожение бактерий, т.е. стерилизация. Для того чтобы вернуть поверхности ее бактерицидные свойства, нами предложен метод повторного отжига TiO<sub>2</sub>-пленок. В этом случае УФ-индуцированная бактерицидность в отношении всех исследуемых штаммов восстанавливалась. Однако такой способ нельзя назвать удовлетворительным, поскольку условия отжига являются достаточно жесткими (высокая температура – 400°C и длительная экспозиция – 5 ч) и по этой причине не могут быть реализованы в медицинских учреждениях. По мере разрешения этой

**Таблица 3.** Число КОЕ бактерий после инкубации под ультрафиолетовым светом (380 нм) в течение 30 мин на поверхности стекла (контроль) и стекла, покрытого TiO<sub>2</sub>-пленками, повторно отожженными (400°C, 5 ч) (опыт)\*

Штамм	Поверхность стекла (контроль)	Поверхность повторно отожженных TiO <sub>2</sub> -пленок (опыт)
<i>S. aureus</i> 956	142.8 ± 15.8	79.2 ± 9.1
<i>S. epidermidis</i> 1061	44.8 ± 9.9	12.8 ± 7.7
<i>E. coli</i> 321-5	87.0 ± 14.0	36.0 ± 15.9

\* Различия между контролем и опытом статистически значимы ( $p < 0.05$ ).

трудности TiO<sub>2</sub>-пленки станут перспективным материалом для покрытия медицинского инструментария, емкостей в пищевой промышленности и т.д., поскольку позволят стерилизовать поверхности в короткие временные интервалы.

Представленная работа выполнена при финансовой поддержке гранта Комиссии Европейского сообщества ЕС FP-6 IST-4 №027976 и гранта Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 27 “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Makowski A., Wardas W. // Current topics of biophysics. 2001. V. 25. № 1. P. 19–21.
2. Wu Y., Jia W., An Q., Liu Y., Chen J., Li G. // Nanotechnology. 2009. V. 20. № 24. P. 245101–245109.
3. Fujishima A., Rao T.N., Tryk D.A. // J. Photochem. Photobiol. 2000. V. 1. № 1. P. 1–21.
4. Gutierrez J., Tercjak A., Garcia I., Peponi L., Mondragon I. // Nanotechnology. 2008. V. 19. № 15. P. 155607–156907.
5. Armealo L., Barreca D., Bottaro G., Gasparotto A., Maccato C., Maragno C., Tondello E., Štancar U. L., Bergant M., Mahne D. // Nanotechnology. 2007. № 18. P. 375709–375715.
6. Masuda H., Hasegawa F., Ono S. // J. Electrochem. Soc. 1997. V. 144. P. 127–130.
7. Суйковская Н.В. Химические методы получения тонких прозрачных пленок. М.: Химия, 1971. 198 с.
8. Лыньков Л.М., Молодечкина Т.В., Богуц В.А. // Докл. БГУИР. 2004. Т. 2. № 1. P. 73–84.
9. Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. // Mutat. Res. 2004. V. 567. № 1. P. 1–61.
10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press. 2007. P. 187–267.

## Photoinduced Bactericidal Activity of TiO<sub>2</sub> Films

S. N. Pleskova<sup>a</sup>, I. S. Golubeva<sup>a</sup>, Yu. K. Verevkin<sup>b</sup>, E. A. Pershin<sup>a</sup>,  
V. N. Burenina<sup>b</sup>, and V. V. Korolichin<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Alexeev Nizhniy Novgorod State Technical University, Nizhniy Novgorod, 603155 Russia  
e-mail: pleskova@mail.ru

<sup>b</sup> Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences, Nizhniy Novgorod, 603150 Russia

Received September 22, 2009

**Abstract**—A decline in CFU of gram-positive and gram-negative bacteria on the surface of UV illuminated TiO<sub>2</sub> films (wavelength of 380 nm) is shown. A 29, 45, and 47% decrease in bacterial viability of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli*, respectively, was seen following a 12-min exposition. It was first discovered that the reuse of TiO<sub>2</sub> films to test a bacterial suspension for viability removes UV-induced bactericidal activity. However, annealing of TiO<sub>2</sub> at a temperature above 400°C restores the photoinduced bactericidal activity to its initial state.