

¹Б.М.КОРСАНТИЯ, ²Г.Н.ПИЧХАЯ, ²Ц.М.СУМБАДЗЕ, ²С.А.МАРКАРЯН,
²С.А.ГВИДАНИ, ³М.Т.ГОГОТИШВИЛИ

**ИСПЫТАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО МОДУЛЯ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ВОДЫ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТАФИЛЛОКОКОВОЙ ИНФЕКЦИИ**

¹Институт медицинской биотехнологии им.В.Бахуташвили, ТГМУ; ²Институт морфологии
им.А.Натишвили, ТГУ, Тбилиси; ³Батумский Государственный Университет им. Шота
Руставели, Грузия

¹B.KORSANTIA, ²G.PICHKHAIA, ²TS.SUMBADZE, ²S.MARKARIAN,
²S.GVIDANI, ³M.GOGOTISHVILI

**TEST OF THE COMBINED MODULE FOR WATER DISINFECTION DURING
EXPERIMENTAL STAPHYLOCOCCUS INFECTION**

TSMU V.Bakhutashvili Institute of Medical Biotechnology; TSU A.Natishvili Institute of
Morphology, Tbilisi; Shota Rustaveli State University, Batumi, Georgia

SUMMARY

The purpose of this study was to test the combined module for water disinfection for the presence of an antimicrobial (*Staphylococcus aureus*) activity in a specific liquid environment. A portable module for drinking and wastewater disinfection (patented in Georgia, GE P 2013 5987B), was taken as an analog. For the first time on the actual material (generator + infected saline) we revealed a reliable bactericidal effect on staphylococci. The intensity of the neutralization of staphylococci mainly depended on the exposure time of the generator, as well as on the initial dose of microbes, i.e., the degree of water pollution. The bactericidal effect of the module was confirmed not only in saline but also in distilled water and household tap water. We emphasize that in this experiment the non-sterile liquid was used for the first time. It also turned out that a 60-second exposure provided reliable antimicrobial protection of the liquids used within the first 6 days of the experiment.

Одной из актуальных задач при обеззараживании питьевой воды, а также промышленных и бытовых стоков, является применение технологии, не использующей химические реагенты, т.е. технологии, не приводящей к образованию токсичных соединений. Известно множество способов обеззараживания воды и биологических жидкостей. Самыми эффективными из них являются хлорирование, ультрафиолетовое и инфракрасное облучение, воздействие ионов серебра или меди, озонирование. Однако у каждого из них имеется один общий, существенный недостаток – неполное уничтожение патогенной микрофлоры даже при длительном воздействии. Уже доказано, что хлорирование воды приводит к образованию опасных побочных продуктов. Анализ альтернативных хлорированию методов дезинфекции воды показал, что все окислительные технологии обеззараживания приводят к формированию тех или иных побочных продуктов, большинство из которых представляют опасность для здоровья людей. Более того, следует учитывать наметившееся в последнее время повышение устойчивости микрофлоры к воздействию хлора, озона и ультрафиолета. Микробиологи ведущих научных центров Америки Азии и Европы показывают в своих отчетах, что за последние 15-20 лет устойчивость патогенной микрофлоры повысилась к хлору, озону и

ультрафиолету – в **3-5** раз [2]. В настоящее время несколько ведущих мировых производителей оборудования для гарантированно качественной обработки воды ведут научные разработки и предлагают технологию совмещенной обработки [2,6]. Уже предложены системы, основанные на комбинации блоков ультразвукового и ультрафиолетового излучения. Точное измерение коэффициента пропускания и проведение модельного облучения позволяют подобрать оптимальное оборудование, отвечающее конкретным условиям [5]. Интенсивно продолжается поиск и внедрение других комбинированных методов обработки воды.

Исходя из вышеизложенного, наше внимание привлек такого типа универсальный прибор, который способен обеззараживать определенную жидкую среду без применения хлора, в минимальном промежутке времени [1,4]. В качестве аналога был взят запатентованный в Грузии модуль для обеззараживания питьевой и сточных вод (патент GE P 2013 5987B и GE P 2019 6967B) [3,4]. Авторы создали оригинальный, настольный импортный мини-модуль. Аппарат представляет комбинированную многостадийную систему обеззараживания воды, которая состоит из семи физических и химических факторов очистки, действующих одновременно (т.н. генератор). В частности: магнитная обработка воды, обработка воды ультразвуком, обработка воды ультрафиолетовыми лучами, озono-воздушной смесью, а также ионами серебра и меди, окисью титана. Одновременно меняется структура и вода приобретает структуру чистой родниковой воды. Вся система обеззараживающая находится в одном модуле. Модуль обеспечивает обеззараживание всего объема обрабатываемой воды путем достижения полного перемешивания воды в течении определенного заданного времени [3,4].

Целью настоящего исследования являлась проверка указанного модуля на наличие противомикробного (*Staphilococcus aureus*) обеззараживающего действия в определенной жидкой среде – физраствор, дистиллированная и водопроводная вода.

Все эксперименты проводились в хронологической последовательности, с постепенным усложнением условий опыта. Конкретно, проводилась коррекция различных параметров в динамике (время **экспозиции** «генератора» модуля в воде, исходная **доза** стафилококков и их **протитрованных** проб, условия **перекрестного** культивирования/ контакта различных образцов и **сроки** высевания микробных проб в питательную среду, **хранение** материала для последующего их анализа). Помимо воды, проверялось также воздействие генератора на дистиллированную воду и физраствор. На начальных этапах опыты осуществлялись в условиях строгой стерильности всех материалов и бокса. После получения первой информации, последующие опыты проводились в нестерильных жидкостях (водопроводная и дистиллированная вода, физраствор и лабораторная посуда, которые были в «чистом»

состоянии). Только на конечном этапе, высеивание микробных проб на питательные среды и их анализ осуществлялся в стерильных условиях.

В этом предварительном, но исключительно важном опыте, впервые на фактическом материале (генератор + зараженная жидкость) нами было выявлено бактериостатическое/бактериоцидное воздействие инсталляции на стафилококки (Опыт 1).

Опыт 1. Влияние экспозиции генератора и доз стафилококков в физрастворе на интенсивность размножения микробов в питательной среде.

	a St.a. = $10^6/1,0\text{мл}$				$10^5/1,0\text{мл}$				$10^4/1,0\text{мл}$				$10^3/1,0\text{мл}$			
	ошной рост(сп.р.)				шной рост(сп.р.)				121				62			

Обозначения: 1) Исходные дозы стафилококка в 1,0мл; 2) Экспозиция генератора в секундах; 3) Результаты подсчета микробных колоний в агаре, через 24 часа; 4) Через 48 часов; 5) Контроль подсчета колоний в исходной жидкости (через 48 часов).

Зафиксировано, что одной минуты заполнения модуля и прохождения зараженного физраствора (в дозе $10^6/1,0\text{мл}$) через генератор было вполне достаточным, чтобы нейтрализовать огромные количества стафилококков (через 48 часов культивирования в 1,0 мл конечного физраствора зафиксировано 117 микробных колоний, а в контроле – сплошной рост микробов). Продление времени воздействия генератора с 90 до 180 секунд, сопровождалось полным отсутствием стафилококков в этих пробах. Остальные результаты этого опыта оказались в прямой зависимости от снижения исходной заражающей дозы с 10^5 до $10^3/1,0\text{мл}$: через 48 часов – количество колоний составило 60-49-24 штук, соответственно.

Таким образом, чисто интуитивно, нами подбирались исходные дозы микробов и время экспозиции генератора в инфицированном физрастворе. В конечном итоге, учитывая особенности рутинного титрования микробов для подбора их конечных концентраций, нам удалось приготовить несколько схем дальнейших экспериментов, обеспечивающих и облегчающих визуализацию микробных колоний на агаре при их подсчете.

Протокол следующего опыта был составлен таким образом, чтобы получить возможно более точную информацию об исходной концентрации стафилококков в «интактном» физрастворе в 100,0 миллилитровом химическом стакане («маточная» взвесь: всего – $5 \cdot 10^7$ м.т., что в 1,0 мл эквивалентно $5 \cdot 10^5$ м.т.), которая находилась в «контакте» с контрольной жидкостью в течение 1 часа, при комнатной температуре. После этого пропускали инфицированный физраствор через работающий модуль. Из первых же 2-3 мл порций, подвергнутых воздействию генератора с разной экспозицией (от 30 до 180 сек), были сформированы соответствующие «рабочие» взвеси в пробирках. После этого, все экспозированные «рабочие» пробы ($25 \cdot 10^3$ м.т. в 1,0 мл) прошли 2-кратное титрование (от 1:2 до 1:4096) в контрольном физрастворе. В стерильных условиях, каждая проба была высеяна на

соответствующую зону агара. Подсчет микробных колоний осуществляли через 48 часов инкубации при 37°C (Опыт 2).

Опыт 2. Интенсивность размножения микробов на агаре в зависимости от различных экспозиций генератора и доз стафилакокков

Время экспозиции (сек.)	Взвешивание (г.)	Концентрация микробов (кол-во)	Генератор	Число выросших микробных колоний при различных сроках экспозиции (сек.)				
				0	30	60	90	120
2	500	р.	р.					
4	300	р.	р.					
8	150	р.	р.					
16	75	р.	р.					
32	36	р.	р.					
64	18	р.	р.					
128	9	р.	р.					
256	4	р.	р.					
512	2	р.	р.					
1024	1	р.	р.					
2048	0	р.	р.					
4096	0	р.	р.					

Эти исследования дополняют предыдущий опыт и выявляют некоторые новые детали. Прежде всего, в отдельных титровальных лунках были подготовлены падающие разведения зараженной жидкости, позволяющие фиксировать точное количество стафилококков в «маточной», «рабочей» и конечной порциях физраствора, что позволит говорить конкретно об нейтрализующей эффективности модуля. Кроме того, можно было анализировать вопросы стандартности и повторяемости результатов этого опыта в последующих исследованиях.

Как и в 1-ом опыте, обеззараживающее действие генератора в модуле начиналось с первых же секунд работы аппарата, а через одну и последующие минуты экспозиции уже можно было говорить о достоверности полученного защитного эффекта. В контрольной жидкости живые микробы обнаруживались в разведении 1:1024, от «рабочей» взвеси. На фоне экспозиции генератора, через 60 сек. этот показатель титра повысился до 1:128; через 90 сек. – до 1:8; а в порциях с 180-секундной экспозицией – из модуля выделялся уже **стерильный** физраствор.

В следующей серии наших экспериментов было проверено влияние состава тестируемой жидкости (физраствор, водопроводная вода, дистиллированная вода) на указанные параметры. Особо подчеркнем, что в этом опыте впервые использовалась нестерильная жидкость, так и лабораторная посуда и микропипетки, которые были в «чистом», нестерильном состоянии. При этих условиях, все жидкости в течение 1-го месяца хранились во флаконах при комнатной температуре (Опыт 3).

Главным выводом проделанного опыта является подтверждение бактериоцидного/ бактериостатического воздействия генератора модуля в жидкостях, не только в физрастворе,

но также в дистиллированной воде и в бытовой водопроводной воде. Интенсивность нейтрализации стафилококков в основном зависела от времени экспозиции, а также от исходной дозы микробов, т.е. степени загрязненности жидкости. Выявлена интересная закономерность, которая заключается в неоднозначности полученных результатов. На фоне почти полного совпадения результатов экспозиции в физрастворе, при сравнении этих данных с пробами воды, выявлены некоторые нюансы, которые требуют своего объяснения.

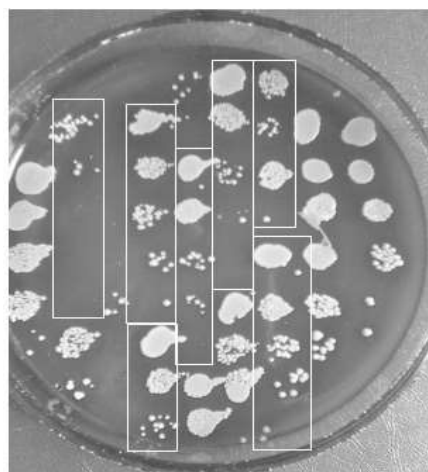
Опыт 3. Интенсивность размножения микробов на агаре в зависимости от различных экспозиций генератора и доз стафилакокков в физрастворе, дистиллированной воде и водопроводной воде

Время экспозиции микробов	дистиллированная вода				водопроводная вода				Физраствор			
6 М.Т.												
5 М.Т.												
4 М.Т.												
3 М.Т.												
2 М.Т.												
1 М.Т.												

Хотя по условиям всех экспериментов, особенно – титрования проб, трудно получить абсолютно точные сравнительные цифры подсчета микробных колоний на агаре и провести строгий статистический анализ, выявилась тенденция в заметном дозозависимом угнетении размножения микробов в дистиллированной воде, как в контроле, так и после воздействия генератора. Результаты подсчета колоний в физрастворе и водопроводной воде были почти одинаковыми, но в «пользу» водопроводной воды. У нас, на данном этапе исследования, нет объяснений подобного «поведения» дистиллированной воды, кроме хорошо известного факта способности такой воды разрушать мембранные структуры клеток (в том числе, микробных) и вызывать их лизис.



Фрагмент из опыта № 2



Фрагмент из опыта №3

В последнем опыте мы постарались ответить на абсолютно логичный вопрос: как долго инсталлированные жидкости могут сохранять свои протекторные свойства. Для этого нами

была предложена следующая схема опыта: все три химических стакана (с физраствором, дистиллированной и водопроводной водой) подвергались экспозиции генератора в течении 60 секунд и хранились во флаконах при комнатной температуре. В определенные сроки (1,3,6,10,15,20 и 25 дни), в отобранные пробы инсталлированных жидкостей добавлялись стафилококковые микробы в дозе 10^4 м.т. После часового контакта, осуществлялся высеv проб на агар и подсчет выросших колоний на 48-й час инкубации (Опыт 4).

Анализ полученных результатов, который основывался на подсчете микробных колоний в пробах и во-многом зависел от условий приготовления и титрации «рабочих» взвесей, позволил сделать, на наш взгляд, интересный вывод: 60-ти секундная экспозиция в модуле, обеспечивала достоверную противомикробную защиту используемых жидкостей в пределах 6-ти суток эксперимента. В последующие сроки дистиллированная вода, физраствор и водопроводная вода теряли дезинфицирующее качество.

Опыт 4. Определение сроков сохранности протекторных свойств экспозиции в жидкостях

Дата	Дистиллированная вода		Водопроводная вода		Физраствор	
	0"	60"	0"	60"	0"	60"
01	57	32	38	35	14	43
03	55	35	33	38	05	47
06	60	39	34	33	п.р.	41
10	59	0	31	0	11	0
15	55	0	34	0	04	0
20	53	0	30	0	09	0
25	51	0	31	0	03	0

Полученный факт потребует серьезного объяснения и дальнейших исследований, но сама возможность «приготовления» воды пролонгированного антимикуробного действия, открывает интересные перспективы практического использования таких жидкостей в различных сферах промышленности и сельского хозяйства, в частности, в медицинской практике.

В заключении можно сделать несколько выводов. Во-первых, нами использован отечественный (стационарный и портативный), комбинированный модуль по обеззараживанию питьевой воды и других жидкостей в эксперименте *in vitro*. На примере стафилококковой инфекции, была выявлен дозозависимый эффект воздействия модуля. Отработаны различные варианты эксперимента, включающие стандартизацию дозировок стафилококков на всех этапах, подбор сроков экспозиции модуля, изучение разных типов жидкостей и, наконец – сохранности протекторного эффекта инсталлированной воды. Во-вторых, проведенное исследование и его результаты, явились тем предварительным и обязательным фоном, который позволит в дальнейшем существенно расширить объекты изучения на различных других экспериментальных моделях (вирусы и микробы, клеточные культуры, преκлинические исследования на лабораторных животных).

ЛИТЕРАТУРА

1. Сумбадзе Ц.М., Маркарян С.А. – Вода и экология, проблемы и инновационное решение// Тр. междунар. конф. «Совр. Пробл. Экологии», Кутаиси, 2018; тVI, 412-413.
2. Blume T., Neis U. – Entkeimung von Abwasser mit Ultraschall in Kombination mit her kommlichen Desinfektions verfahren// Reports – Technische Universitat Hamburg-Harburg, 01.11.2000 - 31.10.2004.
3. Gegechkory T., Mamniashvili G., Markarian S., GavasheliTs. – Synergistic device for water purification and method// Patent of Georgia, GE P 2019 6967 B.
4. MarkaryanS.A. – Method for complex disinfection of water and a module for its implementtation// Patent of Georgia, GE P 2013 5987 B.
5. Гутенев В.В., Ажгиревич А.И., Монтила О.И., Гутенева Е.Н. – Способ обеззараживания воды с использованием озона и ионов серебра// Патент РФ, RU 2 182 124 С1, 2005.
6. Ульянов А.Н. – Применение ультрафиолетового излучения совместно с физическими процессами для обработки воды в небольших населенных пунктах// Журнал «Водоподго-товка», 2004; №1, 13-16.

ბ.კორსანტია, გ.ფიჩხაია, ც.სუმბაძე, ს.მარქარიან, ს.გვიდანია, მ.გოგოტიშვილი
**წყლის გაუნებელყოფისთვის კომბინირებული მოდულის გამოცდა ექსპერიმენტული
სტაფილოკოკური ინფექციის დროს**

თსუ-ის ვლ.ბახუტაშვილის სახ. სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტი;
თსუ-ის ა.ნათიშვილის სახ. მორფოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი; შოთა რუსთაველის
ბათუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტი, საქართველო

რეზიუმე

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა წყლის გაუნებელყოფისთვის კომბინირებული მოდულის შემოწმება ანტიმიკრობული (*Staphilococcus aureus*) მოქმედების არსებობაზე განსაზღვრულთ ხევად გარემოში. ანალოგის სახით აღებულ იქნ ასაქართველოში დაპატენტებული პორტატული მოდული სასმელი და ონკანის წყლის გაუნებელყოფისთვის (საქართველოს მოქმედი პატენტი, GE P 2013 5987B). პირველად, ფაქტიურ მასალაზე (გენერატორი+დაბინძურებული ფიზიოლო-გიური ხსნარი) ჩვენს მიერ გამოვლენილ იქნა სარწმუნო ბაქტერიოციდული ზემოქმედება სტაფილოკოკზე. ამ მიკრობის ნეიტრალიზაციის ინტენსივობა ძირითადად დამოკიდებული იყო გენერატორის ექსპოზიციის დროზე, ასევე მიკრობების საწყის დოზაზე, ე.ი. წყლი სდაბინძურების ხარისხზე. მოდულის ბაქტერიოციდული ზემოქმედება დადასტურებულია არა მხოლოდ ფიზიოლოგიურ ხსნარში, არამედ ასევე გამოხდომილ წყალსა და საყოფაცხოვრებო ონკანის წყალში. ხაზს ვუსვამთ, რომ ამ ცდაში პირველად იქნა გამოყენებული არასტერილური სითხე. ასევე აღმოჩნდა, რომ 60 წამიანი ექსპოზიცია უზრუნველ-ყოფდა წარმოდგენილი სითხეების სარწმუნო ანტიმიკრობულ დაცვას ექსპერიმენტის პირველი 6 დღე-ღამის ფარგლებში.