

УДК 615.322; 614.48; 579.61

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ПЛАЗМОЙ НА УРОВЕНЬ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

О.М. Тихомирова^{1*}, Е.Ю. Загорулько¹, А.А. Ерузин², М.Г. Ожигова¹, М.М. Сычев²

Резюме. Изучена эффективность использования неравновесной низкотемпературной плазмы для снижения уровня микробной контаминации двух видов лекарственного растительного сырья (ЛРС) – ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев. Деконтаминацию ЛРС проводили в экспериментально подобранном режиме: время воздействия плазмы – 5,0 мин, частота тлеющего разряда – 1,76 МГц, рабочее давление плазмы – 0,1 Па, газ – аргон. Установлено, что при обработке в указанных условиях содержание спорообразующих бактерий в исследуемых видах ЛРС снижается на 2 порядка, мицелиальных грибов и дрожжей – на 3 порядка.

Ключевые слова: неравновесная низкотемпературная плазма, ромашки аптечной цветки, мяты перечной листья, деконтаминация, аргон.

THE INFLUENCE OF LOW-TEMPERATURE PLASMA TREATMENT ON MICROBIAL CONTAMINATION LEVEL OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL

О.М. Tikhomirova^{1*}, E.Y. Zagorulko¹, A.A. Eruzin², M.G. Ozhigova¹, M.M. Sychev²

Abstract. Efficacy of non-equilibrium low-temperature plasma treatment for reducing microbial contamination of medicinal plant raw materials (chamomile flowers and peppermint leaves) was studied. Decontamination of plant raw materials was carried out at experimentally defined conditions: exposure time – 5.0 min, glow discharge frequency – 1.76 MHz, working pressure – 0.1 Pa, working gas of plasma – argon. It was found that spore-forming bacteria count after treatment under these conditions decreases by 2 orders of magnitude, yeast and mould count decreases by 3 orders of magnitude.

Keywords: non-equilibrium low-temperature plasma, chamomile flowers, peppermint leaves, decontamination, argon.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», 190013, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, д. 26

1 – St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare, 14 A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

2 – Saint-Petersburg State Institute of Technology, 26, Moskovsky prospect, Saint-Petersburg, 190013, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: olga.tikhomirova@pharminnotech.com

Тел.: 8 (812) 315 24 96

ВВЕДЕНИЕ

Неравновесная низкотемпературная плазма (НТП) представляет собой частично ионизированный газ, в котором содержание положительных и отрицательных зарядов равно. При этом температура тяжелых частиц (400 °С) на несколько порядков меньше температуры электронов (100000 °С), а вся газовая фаза может быть нагрета в пределах 30–100 °С. В такой системе присутствуют различные активные агенты: ионы, возбужденные молекулы, атомы, свободные радикалы, ультрафиолетовое излучение и др. [1–3].

Описано антимикробное действие различных видов НТП в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, их спор, дрожжевых и мицелиальных грибов, вирусов [1, 4–6].

Известны исследования по инактивации эукариотических клеток (микроводорослей) и биопленок бактерий в результате плазменной обработки [7–10]. Воздействие НТП может быть использовано для антисептической обработки живых тканей, дезинфекции и стерилизации различных поверхностей и объектов, в частности изделий из термостабильных материалов, а также жидкостей и воздуха [11–13].

В ряде стран, в том числе в Германии и США, плазменная обработка пищевых продуктов растительного происхождения одобрена различными регулирующими организациями как безопасный и эффективный способ увеличения их срока годности [14–16]. Известны исследования по обработке лекарственного растительного сырья (ЛРС), в которых плазму используют как с целью

модификации технологических свойств сырья, так и для его частичной деконтаминации [17, 18].

Конечный эффект плазменного воздействия определяется видом микроорганизма, особенностями состава окружающей его среды, условиями обработки и типом источника НТП [1]. В связи с этим представляло интерес изучение возможности применения плазменной деконтаминации некоторых официальных видов ЛРС (ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев) как с естественным уровнем микробной загрязнённости, так и искусственно контаминированных спорообразующими бактериями, мицелиальными и дрожжевыми грибами, типичными для растительно-го сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали по две серии обоих видов ЛРС, приобретенного через аптечную сеть и у организации-производителя: ромашки аптечной цветки (серия Р₁: ООО «СОИК», номер серии 040615; серия Р₂: АО «Красногорсклексредства», номер серии 130616), мяты перечной листья (серия М₁: ООО «СОИК», номер серии 150815; серия М₂: ООО Фирма «Здоровье», номер серии 020216).

Обработку ЛРС низкотемпературной плазмой проводили на ионно-плазменной камерной модифицированной вакуумной установке ННВ-6,6И1 (Россия) на кафедре химии твердого тела СПбГТИ(ТУ). Основными варьируемыми параметрами технологического процесса плазменной обработки являлись: состав газовой фазы, время экспозиции в активной зоне разряда, рабочее давление газа плазмы, частота тлеющего разряда. Известно, что механизм антимикробного действия НТП зависит от состава газовой фазы. При этом наибольшие различия наблюдаются между газами окислительной и инертной природы [9, 16]. В связи с этим представляло интерес изучение влияния на уровень микробной контаминации ЛРС газов, различающихся по окислительной способности. В настоящем исследовании были использованы следующие режимы плазменной обработки ЛРС, подобранные с учетом анализа литературных данных [1, 17] и результатов собственных исследований: время экспозиции в активной зоне разряда – 1 или 5 мин, частота тлеющего разряда – 1,76 МГц, рабочее давление газа плазмы – 0,1 Па, газы – кислород (газовая фаза окислительного состава) или аргон (газовая фаза инертного состава).

Определение микробиологической чистоты ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев проводили в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания [19]. Определяли показатели, предусмотренные для ЛРС, в технологии обработки которого не используется кипящая вода (категория 4Б): общее число аэробных микроорганизмов в 1 г; общее число дрожжевых и плесневых грибов

в 1 г; содержание энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г; отсутствие *E. coli* в 1 г. Все опыты для каждой серии ЛРС проводили в трех повторностях.

Для искусственной контаминации ЛРС в качестве тест-культур использовали штаммы типичных представителей спорообразующих бактерий (как более устойчивых к воздействию НТП) – *Bacillus subtilis* ATCC 6633, дрожжей – *Rhodotorula rubra* 341, мицелиальных грибов – *Aspergillus niger* 2a (из коллекции микробных культур кафедры микробиологии ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России).

Получали суспензии спор, клеток или конидий тест-культур в стерильном фосфатном буфере с концентрацией: *B. subtilis* – 10⁸ сп/мл, *R. rubra* – 10⁷ кл/мл, *A. niger* – 10⁷ кон/мл. Навески ЛРС, подлежащие контаминации, обрабатывали взвесью соответствующей тест-культуры, перемешивали и подсушивали при температуре 42±1 °С. Обработанное ЛРС разделяли на две части (опыт и контроль). Опытный образец подвергали плазменной обработке.

В опытном и контрольном образцах проводили определение числа бактерий и грибов чашечным агаровым методом, используя модифицированный глубинный метод посева, по методике, описанной в ОФС.1.2.4.0002.15 [19].

Для определения влияния НТП на уровень микробной контаминации ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев навеску ЛРС соответствующей серии подвергали обработке на ионно-плазменной камерной вакуумной установке ННВ-6,6И1 в указанных условиях, определяли микробиологическую чистоту ЛРС после плазменного воздействия и сравнивали полученные результаты с исходным уровнем контаминации сырья.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» Государственной фармакопеи XIII издания [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ЛРС с естественным уровнем микробной контаминации

На первом этапе исследовали влияние плазменной обработки на уровень микробной контаминации ромашки аптечной цветков (серии Р₁ и Р₂) и мяты перечной листьев (серии М₁ и М₂). Предварительно определили исходный уровень микробной контаминации указанных серий ЛРС.

Обработку низкотемпературной плазмой в среде газов окислительной (кислород) и инертной (аргон) природы проводили в условиях: время воздействия – 1,0 мин, частота тлеющего разряда – 1,76 МГц, рабочее давление плазмы – 0,1 Па. Результаты представлены в таблице 1.

На основании анализа данных, приведённых в таблице 1, установлено, что общее содержание аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов в ЛРС, обработанном НТП, снижается по сравнению с необработанным сырьём (различия достоверны при уровне значимости 95%). Следует отметить, что только в образцах мяты перечной листьев обеих серий не происходило значительного снижения содержания общего числа аэробных микроорганизмов. При этом для всех исследуемых серий ЛРС уменьшение общего числа грибов составляло 1–2 порядка в зависимости от вида плазмы. Наиболее существенное снижение содержания грибов было отмечено после обработки всех исследованных серий ЛРС плазмой аргона.

Большая выраженность антимикробного действия инертного газа плазмы (аргона) по сравнению с окислительным (кислородом) может быть объяснена тем, что в случае обработки в условиях пониженного давления наибольший вклад в реализацию антимикробного эффекта вносит коротковолновое ультрафиолетовое излучение. Известно, что возбужденные атомы аргона являются мощным источником данного излучения, что обеспечивает выраженность антимикробного эффекта [9, 10]. Следует учитывать также вклад непосредственной бомбардировки клеток микроорганизмов атомами аргона, обладающими большой молекулярной массой и высокими значениями кинетической энергии. Роль свободных радикалов кислорода повышается в плазме атмосферного давления [1, 9, 10]. Поскольку в эксперименте обработка проводилась в условиях вакуума, для дальнейших исследований был выбран газ аргон.

Плазменная обработка искусственно загрязнённого ЛРС

Поскольку все использованные в исследовании серии ЛРС соответствовали по микробиологической чистоте требованиям ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», было проведено моделирование ситуации обработки НТП сырья с повышенным уровнем микробной контаминации. Контаминировали образцы мяты перечной листьев серии М₂ и ромашки аптечной цветков серии Р₁ типичными тест-культурами спорообразующих бактерий (*B. subtilis*), дрожжей (*R. rubra*) и мицелиальных грибов (*A. niger*). Выбор спорообразующих бактерий был обусловлен тем, что именно эндоспоры бактерий из-за особенностей состава и строения наиболее устойчивы к воздействию НТП [1, 6]. Из литературных источников также известно, что наличие пигментов (каротиноидов, меланинов) в клетках грибов, в том числе и указанных видов, способствует их большей устойчивости к разным видам антимикробных агентов, в том числе ионизирующего и ультрафиолетового излучений [20, 21].

На основании результатов проведенных исследований для плазменной обработки был выбран газ аргон, однако длительность обработки увеличили до 5 мин, поскольку эффективность обработки НТП существенно зависит от времени экспозиции в активной зоне разряда [1, 17]. Дальнейшее увеличение длительности обработки было нецелесообразно в связи с технологическими особенностями установки.

Таким образом, на следующем этапе обработку НТП проводили в условиях: время воздействия – 5,0 мин, частота тлеющего разряда – 1,76 МГц, рабочее давление плазмы – 0,1 Па, газ – аргон.

Таблица 1.

Исследование влияния НТП различного газового состава на уровень микробной контаминации ЛРС

ЛРС		Общее число аэробных микроорганизмов, КОЕ в 1,0 г	Общее число дрожжевых и плесневых грибов, КОЕ в 1,0 г	Энтеробактерий, устойчивых к желчи, КОЕ в 1,0 г	<i>E. coli</i> в 1,0 г
Р ₁	необработ.*	$(4,1 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^3$	менее 10 ¹	отсутствие
	O ₂	$(1,9 \pm 0,7) \cdot 10^5$	$(1,0 \pm 0,5) \cdot 10^2$	менее 10 ¹	отсутствие
	Ar	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(3,0 \pm 0,9) \cdot 10^1$	менее 10 ¹	отсутствие
Р ₂	необработ.	$(2,1 \pm 0,8) \cdot 10^6$	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^5$	менее 10 ¹	отсутствие
	O ₂	$(3,1 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^3$	менее 10 ¹	отсутствие
	Ar	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(4,0 \pm 0,5) \cdot 10^2$	менее 10 ¹	отсутствие
М ₁	необработ.	$(3,9 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^3$	менее 10 ¹	отсутствие
	O ₂	$(3,0 \pm 0,9) \cdot 10^4$	$(7,5 \pm 1,6) \cdot 10^1$	менее 10 ¹	отсутствие
	Ar	$(1,9 \pm 0,8) \cdot 10^4$	$(3,0 \pm 0,9) \cdot 10^1$	менее 10 ¹	отсутствие
М ₂	необработ.	$(4,1 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(3,5 \pm 0,6) \cdot 10^2$	менее 10 ¹	отсутствие
	O ₂	$(3,1 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(3,0 \pm 0,9) \cdot 10^1$	менее 10 ¹	отсутствие
	Ar	$(3,4 \pm 0,9) \cdot 10^3$	менее 10 ¹	менее 10 ¹	отсутствие
Требования ГФ XIII для ЛРС категории 4Б		не более 10 ⁵	не более 10 ⁴	не более 10 ³	отсутствие

Примечание: * – «необработ.» – показатели для ЛРС, не обработанного плазмой.

Определяли уровень микробной контаминации искусственно загрязненных образцов, обработанных НТП (опыт) и не обработанных НТП (контроль). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Влияние плазменной обработки на содержание микроорганизмов в образцах искусственно контаминированного ЛРС

ЛРС		Содержание микроорганизмов в ЛРС, КОЕ в 1,0 г		
		<i>B. subtilis</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. rubra</i>
M ₂	Контроль	(2,8±0,7) · 10 ⁴	(1,4±0,4) · 10 ⁵	(6,9±0,6) · 10 ³
	Опыт	(4,8±0,3) · 10 ²	(2,0±0,5) · 10 ²	менее 10 ¹
P ₁	Контроль	(4,1±0,5) · 10 ⁶	(1,8±0,2) · 10 ⁵	(2,2±0,1) · 10 ³
	Опыт	(2,7±0,6) · 10 ⁴	(3,9±0,4) · 10 ²	менее 10 ¹

Анализ данных, представленных в таблице 2, показал, что в искусственно контаминированных образцах ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев, обработанных НТП, общее содержание аэробных спорообразующих бактерий снижается по сравнению с необработанным ЛРС на 2 порядка, мицелиальных и дрожжевых грибов – на 3 порядка (различия достоверны при уровне значимости 95%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что обработка НТП разных серий ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев приводит к достоверному снижению уровня их микробной контаминации. При проведении плазменной обработки ЛРС плазмой аргона в течение 5,0 мин при частоте тлеющего разряда 1,76 МГц, рабочем давлении плазмы 0,1 Па содержание аэробных спорообразующих бактерий снижается на 2 порядка, мицелиальных грибов и дрожжей – на 3 порядка.

Таким образом, обработка НТП может быть использована для снижения уровня микробной контаминации и, следовательно, вероятности биопорчи мяты перечной листьев и ромашки аптечной цветков в процессе хранения ЛРС.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Fridman, G. Friedman. Plasma medicine. – London: John Wiley & Sons, 2013. 545 p.
2. Л.С. Полак. Теоретическая и прикладная плазмохимия. – М.: Наука, 1975. 154 с.
3. Ю.А. Лебедев. Введение в плазмохимию. – Новосибирск: Наука, 1994. 89 с.
4. O.J. Cahill, T. Claro, N. O'Connor et al. Cold air plasma to decontaminate inanimate surfaces of the hospital environment // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. № 6. P. 2004–2010.
5. K. Oehmigen, J. Winter, M. Hähnel et al. Estimation of possible mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by plasma treated sodium chloride solution // Plasma Process. Polym. 2011. V. 8. № 10. P. 904–913.
6. H. van Bokhorst-van de Veen, H. Xie, E. Esveld et al. Inactivation of chemical and heat-resistant spores of *Bacillus* and *Geobacillus* by nitrogen cold atmospheric plasma evokes distinct changes in morphology and integrity of spores // Food Microbiol. 2015. V. 45. P. 26–33.
7. M.Y. Alkawareek, S.P. Gorman, W.G. Grahamb. Eradication of marine biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma: A potential approach to control biofouling? // Int. Biodeterior. Biodegr. 2014. V. 86A. P. 14–18.
8. G. Brelles-Marico. Challenges in biofilm inactivation: the use of cold plasma as a new approach // Bioprocessing & Biotechniques. 2012. V. 2. № 4. P. 107–111.
9. M. Laroussi. Low-temperature plasmas for medicine? // Trans. Plasma Sci. 2009. V. 37. № 6. P. 714–725.
10. M. Laroussi. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art // Plasma Process. Polym. 2005. № 2. P. 391–400.
11. V. Boxhammer, G. E. Morfill, J. R. Jokipii. Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution // New J. Physics. 2012. V. 14. P. 113042–113060.
12. N. O'Connor, O. Cahill, S. Daniels. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? // J. Hosp. Inf. 2014. V. 88. № 2. P. 59–65.
13. M. Naïtali, G. Kamgang-Youbi, J.-M. Herry. Combined effects of long-living chemical species during microbial inactivation using atmospheric plasma-treated water // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 76. № 22. P. 7662–7664.
14. Anwendung von Plasmaverfahren zur schonenden Haltbarmachung am Beispiel verderblicher Lebensmittelprodukte in der Nacherte (FriPlas). URL: <https://www.atb-potsdam.de/forschungsprogramme/projekt.html?xq=229> (дата обращения 03.06.2017).
15. L.F. Pivarnik, R. Worobo. Non-thermal or alternative food processing methods to enhance microbial safety and quality // NIFA–USDA Bulletin. 2014. 8 p. URL: <http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/227891.pdf> (дата обращения 24.06.2017).
16. V.A. Niemira. Cold plasma decontamination of foods // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2012. V. 3. P.125–142.
17. Патент РФ № 2428203 С1, МПК А61К 41/00. Способ деконтаминации лекарственного растительного сырья / М.В. Богма, А.А. Ерузин, Т.С. Потехина, Л.М. Манойлова, И.Б. Гавриленко; патентообладатель Санкт-Петербургский гос. технологический ин-т. – № 2010119315/15; заявл. 13.05.10; опубл. 10.09.11.
18. Патент РФ № 2484838 С1, МПК А61К 36/00. Способ подготовки измельченного лекарственного растительного сырья (ЛРС) для таблетирования методом прямого прессования / М.М. Сычев, А.А. Ерузин, И.Б. Гавриленко, М.В. Богма, Л.М. Манойлова; патентообладатель Санкт-Петербургский гос. технологический ин-т. – № 2011132534/15; заявл. 02.08.11; опубл. 20.06.13.
19. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание. Т. 1. – М. 2015. 1470 с. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/ pharmacopoeia_1.html/HTML/ (дата обращения 01.03.2017).
20. I. Mannazzu, S. Landolfo, T. Lopes da Silva et al. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest // World J. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 31. № 11. P. 1665–1673.
21. Н.Н. Гесслер, А.С. Егорова, Т.А. Белозерская. Меланиновые пигменты грибов в экстремальных условиях существования // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 125–134.