

УДК 579.088;577.158.54

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ КИНЕТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ АДсорБЦИИ НА НИЗКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТЯХ

В.В. Федорович, С.В. Калюжный, \*П. Ван дер Мирен и \*В. Верстрает

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: Vfedorovich@enzyme.chem.msu.ru)

Исследована предложенная ранее математическая модель кинетики бактериальной адсорбции на полимерных материалах с различной степенью гидрофобности. Описаны процедура калибровки и алгоритм расчета для моделирования на основе модели. Модель использована для описания экспериментальных данных по бактериальной адсорбции бактерий *Escherichia coli* (штамм 055) и *Listeria Monocytogenes* на разных полимерных поверхностях. Теоретический прогноз результатов эксперимента показал, что точность прогноза уменьшается с уменьшением величины контактного угла на поверхности полимера.

В нашей предыдущей работе [1] были получены основные дифференциальные уравнения модели кинетики бактериальной адсорбции. Главной проблемой, решенной в первой части, была проблема разложения движущих сил адсорбции в зависимости от природы их происхождения. Данная работа посвящена процедуре калибровки и теоретическим предсказаниям на основе данной модели. В связи с этим возникает другая важная проблема – проблема сравнения результатов разных экспериментов по адсорбции, в основе которой лежит так называемый протокол адгезии, включающий экспериментальные условия получения рассматриваемых данных. К сожалению, разные авторы используют и разные протоколы адгезии. Разработанная в [1] модель через специально вводимый параметр в некоторой степени снимает эту неопределенность.

### Калибровка модели

**Экспериментальные данные для калибровки модели.** Экспериментальные данные, используемые для калибровки модели, были взяты из работы [2]. В этом эксперименте бактерии *Escherichia coli* (штамм 055) были выращены на агаре в течение 24 ч при температуре 37°. Микроорганизмы *Listeria Monocytogenes* были выращены на питательной среде, содержащей сою, в течение 48 ч при температуре 37°. Далее бактерии были осаждены, отмыты три раза в солевом растворе Хэнка с помощью повторного центрифугирования и затем ресуспендированы в жидкую среду с заданным значением поверхностного натяжения (последнюю величину варьировали с помощью изменения концентрации ДМСО в солевом растворе Хэнка [2]).

Далее на поверхности был нанесен 1 мл бактериальной суспензии, содержащей  $10^8$  бактерий в соответствующей среде. Бактерии были инкубированы в течение 30 мин при  $T = 21^\circ$ , после чего поверхности были промыты средой Хэнка для удаления неадгезированных к поверхности бактерий. После сушки образцов подсчитывали количество клеток, адсорбированных на поверхности. Информация о контактных углах бактериальных и адсорбирующих поверхностей, используемых в экспериментах, представлена в табл. 1, 2.

### Вычислительный метод

Расчеты были проведены на персональном компьютере фирмы IBM (процессор Pentium-200). Компьютерная программа была написана на языке Фортран-90. Входными параметрами были: величина контактного угла жидкости на поверхности бактериальной клетки, величина контактного угла среды на поверхности полимера, поверхностное натяжение среды, плотность клеток в среде и средняя проектируемая площадь бактериальной клетки. Выходным параметром было число клеток, адсорбированных на единице поверхности в течение заданного интервала времени. Численное интегрирование дифференциальных уравнений было проведено по методу трапеций [3].

Расчеты были проведены в соответствии с алгоритмом, изложенным в пунктах ( $I_A - I_D$ ):

$I_A$  – вычисление  $\gamma_{SV}$  на основании экспериментальных величин  $\gamma_{LV}$ ,  $\cos\Theta_{SL}$  (табл. 1) по уравнениям (5), (6);

$I_B$  – вычисление  $\gamma_{BV}$  на основании экспериментальных величин  $\gamma_{LV}$ ,  $\cos\Theta_{BL}$  (табл. 1) по уравнениям (7), (8);

\*Группа межфазных технологий; \*\*лаборатория микробной экологии факультета прикладных биологических наук и сельского хозяйства университета г. Гент; Гент В-90000, Бельгия).

Т а б л и ц а 1

**Экспериментально определенные величины контактных углов на полимерах для воды ( $\gamma_{LV} = 72,0$  мН/м)**

Полимер		
Материал	Контактный угол с водой (°)	Поверхностное натяжение, $\gamma_{sv}$ (мН/м)
Фторированный сополимер этилена и пропилена	110±3	16,7±1,7
Полистирол	95±2	25,6±1,2
Полиэтилен низкой плотности	84±4	32,5±2,5
Ацеталевая смола	64±1	44,8±0,6
Сульфонированный полистирол	24±3	66,4±1,3

Примечание. Соответствующая величина поверхностного натяжения вычислена с помощью уравнения состояния.

Т а б л и ц а 2

**Экспериментально определенные величины контактных углов на бактериях для солевого раствора Хэнка ( $\gamma_{LV} = 72,8$  мН/м)**

Микроорганизмы		
Штамм	Контактный угол с солевым раствором (°)	Поверхностное натяжение $\gamma_{bv}$ (мН/м)
<i>E. coli</i> 055	16,7±1,0	69,9±0,3
<i>L. monocytogenes</i>	26,1±1,2	66,3±0,5

Примечание. Соответствующие величины поверхностных натяжений вычислены с помощью уравнения состояния.

$I_C$  – вычисление  $\gamma_{BS}$  на основании вычисленных выше величин  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{BV}$  при использовании аналогичного набора уравнений, вытекающих из уравнения Юнга, и уравнения состояния;

$I_{D1}$  – введение текущей величины  $\gamma_{LV}$ ;

$I_{D2}$  – вычисление  $\gamma_{SL}$ ,  $\cos\Theta_{SL}$  с помощью  $\gamma_{SV}$  и  $\gamma_{LV}$ ;

$I_{D3}$  – вычисление  $\gamma_{BL}$ ,  $\cos\Theta_{BL}$  с помощью  $\gamma_{BV}$  и  $\gamma_{LV}$ ;

$I_{D4}$  – вычисление  $\Delta G_h$  с помощью  $\gamma_{BL}$ ,  $\gamma_{SL}$  и  $\gamma_{BS}$ ;

$I_{D5}$  – численное интегрирование дифференциальных уравнений (1), (3);

$I_{D6}$  – возврат к шагу  $I_{D1}$ .

При рассмотрении различных сред для заданной комбинации поверхность твердого тела – тип бактерий пункты от  $I_A$  до  $I_C$  выполняются один раз, в то время как пункты от  $I_{D1}$  до  $I_{D6}$ , повторяются для каждой рассматриваемой величины поверхностного натяжения среды.

**Идентификация параметров модели**

Калибровка модели была осуществлена на части данных описанного выше эксперимента. В этом эксперименте были использованы бактерии с контактным углом не более 30° и концентрацией  $N_{ext} = 10^{14}$  1/м<sup>3</sup>. Идентификация величин  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  и  $\Psi$  в уравнениях (1), (2) [1] была проведена для *L. monocytogenes* и для фторированного этилен-пропилен сополимера (рис. 1, а). Процедура идентификации, основанная на методе наименьших квадратов, в рассмотренном случае позволила получить следующие значения для величин:  $\phi_1 = 6 \cdot 10^{-8}$  (м/с),  $\phi_2 = 0,205$  (м/мН),  $\Psi_{monocyt} = 1,05$ . Точность идентификации была выше 95%. Для культуры *E. coli* и для того же материала единственным, подлежащим идентификации параметром был  $\Psi_{E. coli}$ . В области  $\Delta G_h > 0$  последний оказался равным 0,56. Для этого случая численные значения для величин  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  были взяты равными величинам, полученным для культуры *L. monocytogenes*. Здесь мы используем тот факт, что, согласно нашему подходу, величины контактных углов и поверхностных натяжений однозначно определяют скорость адсорбции, обусловленную гидрофобными взаимодействиями, независимо от природы взаимодействующих поверхностей.

Результаты процедуры идентификации и соответствующие экспериментальные данные представлены на рис. 1, а. Следует отметить, что механизм, управляющий плотностью бактерий на поверхности, имеет стохастическую природу. Следовательно, площадь проекции бактериальной клетки ( $S^{BAC}$ ) является случайной величиной.

В наших вычислениях величина этого параметра была принята равной  $1,44 \cdot 10^{-12}$  м<sup>2</sup>. Данная величина коррелирует с типичным геометрическим размером бактерии. Для упрощения сравнения наших результатов с экспериментальными данными, функция  $N(t)$  представлена на всех графиках в единицах (число бакт)/10<sup>4</sup>мм<sup>2</sup>.

**Результаты и обсуждение**

Для использования разработанной модели необходимо осмыслить структуру параметров  $\Psi_{monocyt}$  и  $\Psi_{E. coli}$ , поскольку никаких теоретических предположений о них выше не было сделано. В вычислительной процедуре эти функции были использованы как постоянные. Анализ экспериментальных данных дает возможность сделать некоторые предположения о них. Экспериментальные данные, характеризующие адсорбцию *E. coli* (рис. 1, а), содержат область поверхностного натяжения жидкости (64–69 мН/м), где  $\Delta G_h > 0$ . Внутри этой области  $\Delta G_h$  изменяется значительно. Тем не менее число адсорбированных клеток на единице площади внутри данного интервала не зависит от величины поверхностного натяжения жидкости. Если бы отталкивание внутри данной области

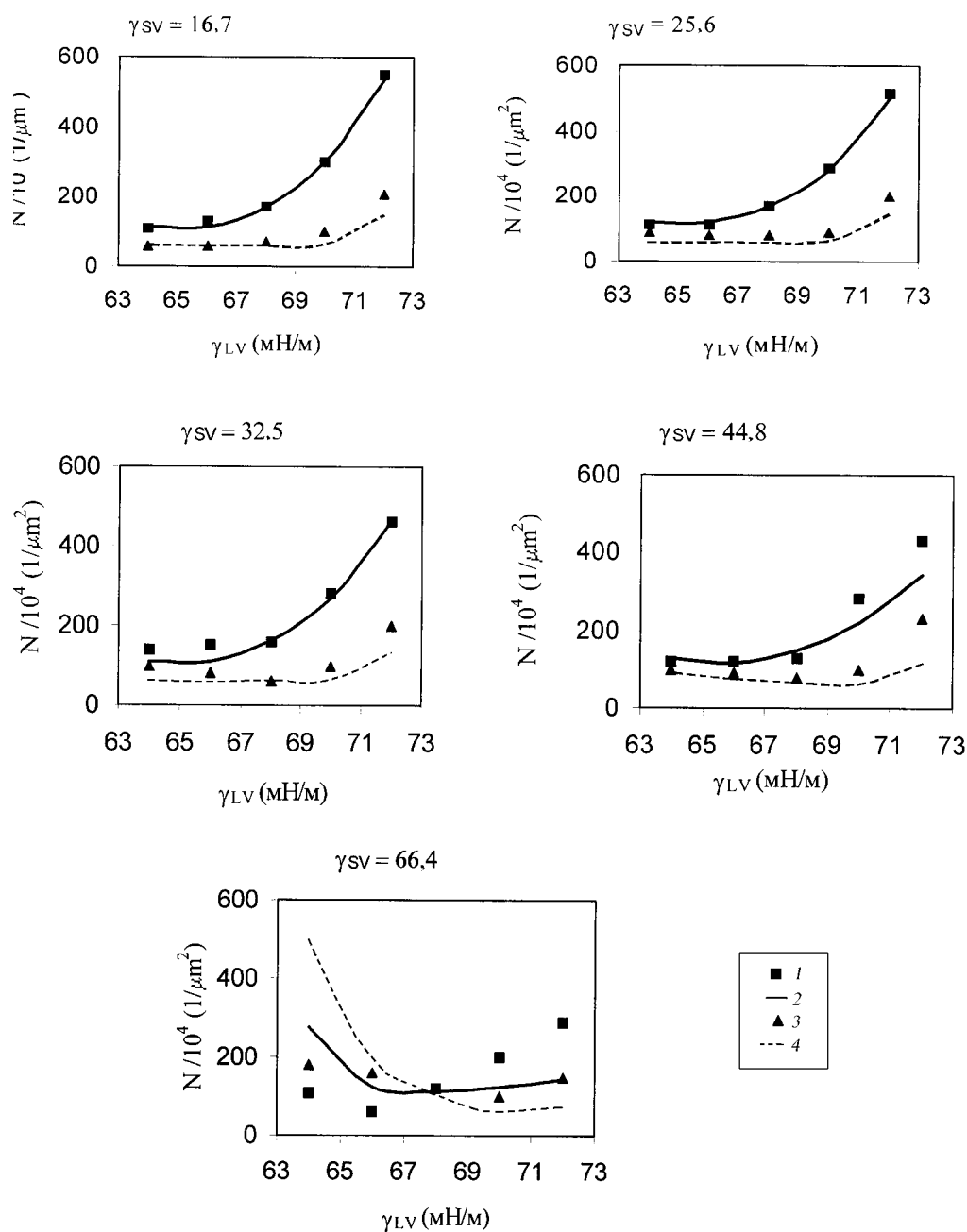


Рис. 1. Число бактерий адсорбированных на ед. площади в течение 30 мин в зависимости от поверхностного натяжения жидкости (конц. клеток в окружающей среде  $10^8$  кл/мл): а – фторированный сополимер этилена и пропилена, б – полистирол, в – полиэтилен низкой плотности, г – ацеталевая смола, д – сульфированный полистирол (1 – *L. monocytogenes* экспер.; 2 – *L. monocytogenes* модель; 3 – *E. coli* 055 экспер.; 4 – *E. coli* 055 модель)

имело место, то число адсорбированных клеток должно было бы уменьшиться. Однако из эксперимента этого не следует. Этот факт был обобщен и использован для определения величин  $\Psi_{\text{monocyt}}$  и  $\Psi_{E. coli}$  как постоянных внутри области  $\Delta G_h > 0$ . Из эксперимента также видно, что число бактерий, адсорбированных на единице площади в области меньших значений величин поверхностного натяжения жидкости, не

так сильно зависит от типа адсорбирующего материала. На основании этого факта предположили, что все определяется типом бактерий.

С учетом сделанных выше предположений модель использовали для описания остальной части экспериментальных данных. Получение констант  $\phi_1$ ,  $\phi_2$ ,  $\Psi_{\text{monocyt}}$  и  $\Psi_{E. coli}$  из процедуры калибровки для одного типа материала позволило сделать прогноз для описа-

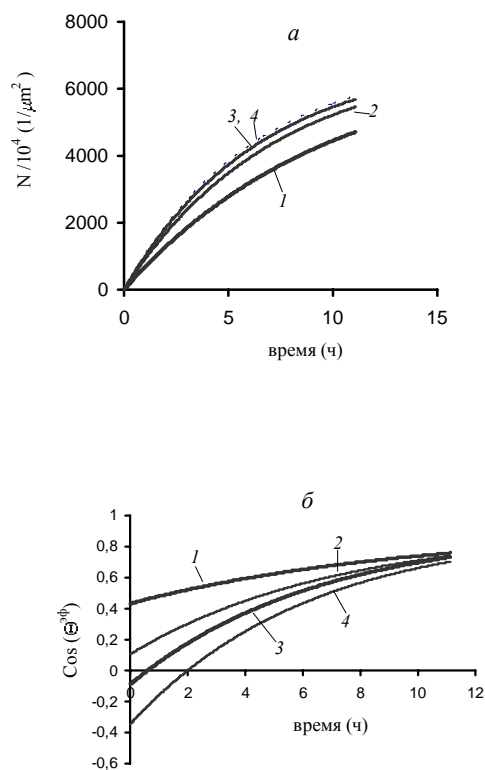


Рис. 2. Результаты моделирования адсорбционного процесса для клеток *L. monocytogenes* ( $\gamma_{BV} = 66,3$  мН/м) из водной фазы ( $\gamma_{LV} = 72$  мН/м) для разных типов адсорбирующих материалов ( $\gamma_{SV}$ , мН/м: 1 – 44,8; 2 – 32,5; 3 – 25,6; 4 – 16,7); а – динамика бактериального накопления в зависимости от времени, б – динамика изменения эффективного контактного угла в зависимости от времени

ния всех остальных типов материалов с использованием тех же самых констант. Теоретические и экспериментальные кривые приведены на рис. 1, б–д. На рис. 1 видно, что точность прогноза результатов эксперимента уменьшается с уменьшением величины контактного угла на поверхности полимера. Тем не менее теоретический прогноз дал приемлемые величины для числа бактерий, адсорбированных на единице площади для материалов с контактным углом не более  $60^\circ$ . Кривые, приведенные на рис. 1, д, демон-

стрируют несовпадение между моделью и экспериментом. Следовательно, в ситуации, когда рассматривается адгезия гидрофильных микроорганизмов к гидрофильным поверхностям, наш подход не дает требуемой точности. Это можно объяснить неприменимостью уравнения состояния к гидрофильным поверхностям.

Теоретический прогноз кинетики адсорбции для *L. monocytogenes* представлен на рис. 2, а. Расчеты были проведены для нескольких видов адсорбирующих материалов при фиксированной величине поверхностного натяжения жидкости (72 мН/м) в предположении, что контактный угол может быть стабилен на протяжении достаточно длинного промежутка времени. Все кривые на рис. 2, а стремятся к предельному значению, соответствующему ситуации полного заполнения поверхности. Кривые на рис. 2, б показывают динамику изменения эффективного контактного угла поверхности полимера от времени, выраженную уравнением (9). Кривые на рис. 2, б, так же, как и кривые рис. 2, а, стремятся к предельным величинам, представляющими собой контактный угол поверхности бактериальной стенки. Следует отметить, что существование этой предельной величины является следствием бактериального отталкивания, постулированного в данной работе.

По результатам проведенной работы можно сделать следующие выводы. Разработанная модель способна описывать с приемлемой точностью скорость бактериальной адсорбции для бактерий с контактным углом не выше  $30^\circ$  и для поверхностей с контактным углом не ниже  $60^\circ$ . Точность прогноза числа бактерий, адсорбированных на единице площади в единицу времени, уменьшается с уменьшением величины контактного угла адсорбирующей поверхности. Существование отталкивания между бактериями приводит к возникновению предельной величины числа бактерий, адсорбированных на единице площади. Первый член в уравнении (1), характеризующий гидрофобную часть кинетики, имеет сходство с законом Аррениуса для кинетики химической реакции первого порядка.

ПРИЛОЖЕНИЕ  
Номенклатура

$\Psi$  – величина вклада негидрофобных взаимодействий в адсорбционный процесс (безразмерна); BL – интерфейс бактериальная клетка–жидкость; BS – интерфейс бактериальная клетка полимер; BV – интерфейс бактериальная клетка–водяной пар;  $\Delta G_h$  – гидрофобная часть свободной энергии адгезии (мН/м);  $N(t)$  – число бактерий адсорбированных на единице площади ( $1/\mu\text{m}^2$ );  $N_{\text{ext}}$  – число бактерий в окружающей среде ( $1/\mu\text{m}^3$ ); SL – интерфейс полимер–жидкость; SV – интерфейс полимер–водяной пар;  $S^{\text{access}}$  – площадь поверхности, доступная для

бактерий ( $\text{m}^2$ );  $S^{\text{tot}}$  – поверхность материала, участвующая в адгезионном процессе ( $\text{m}^2$ );  $S^{\text{bac}}$  – площадь проекции бактериальной клетки ( $\text{m}^2$ );  $\gamma_{LV}$  – поверхностное натяжение жидкости (мН/м);  $\gamma_{BL}$  – межфазное натяжение в системе бактериальная клетка–жидкость (мН/м);  $\gamma_{SL}$  – межфазное натяжение в системе полимер–жидкость (мН/м);  $\gamma_{BS}$  – межфазное натяжение в системе бактериальная клетка–полимер (мН/м);  $\gamma_{SV}$  – межфазное натяжение в системе полимер–водяной пар (мН/м);  $\gamma_{BV}$  – межфазное натяжение в системе бактериальная клетка–водяной пар (мН/м);

$\phi_1$  – постоянная (м/с);  $\phi_2$  – постоянная (м/мН);  $\Theta_{SL}$  – контактный угол жидкости на поверхности бактериальной клетки (°);  $\Theta_{SL}$  – контактный угол жидкости на поверхности полимера (°);  $\Theta_{SL}^{\text{эф}}$  – эффективный контактный угол жидкости на поверхности полимера частично занятого бактериями (°).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федорович В.В., Калужный С.В., П. ван дер Мирен, Верстрает П. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. **43**. С. 416.
2. Absolom D.R., Lamberti F.V., Policova Z., Zingg W. et al. // Appl. and Envir. Microbiology. **46**. 1983. P. 90.
3. Милн В.И. Численные методы решения дифференциальных уравнений. М., 1955. С. 287.

Поступила в редакцию 25.10.02