



УДК 578+537.533.35

ВЛИЯНИЕ ТРЕТИЧНЫХ АЛКИЛАМИНОВ НА БИОПЛЕНКИ, ОБРАЗОВАННЫЕ *ESCHERICHIA COLI* И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Л.В. Диденко¹, Т.А. Смирнова¹, Э.Р. Толордава¹, М.В. Зубашева¹, Г.Г. Кардаш², Д.А. Куршин², О.В. Емшанов², Г.А. Автандилов³

¹ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», Москва;

²ООО «ИНТЕРСЭН-плюс», Мытищи, Московская область;

³Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова

Изучено воздействие дезинфицирующего средства (на основе третичных алкиламинов) на биологические пленки сформированные клиническими изолятами *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Методом сканирующей электронной микроскопии выявлен выраженный повреждающий эффект на экзополисахаридный матрикс биопленок и разрушение бактерий внутри него. Определены предварительные концентрации средства на основе третичных алкиламинов для оказания микробицидного эффекта на бактерии в составе биопленок.

Ключевые слова: дезинфицирующие средства, биопленки, третичные алкиламины, экзополисахаридный матрикс, разрушение биопленки, дезинфицирующее средство для борьбы с биопленками.

Одним из наиболее важных достижений медицинской и клинической микробиологии последних лет является открытие и изучение биопленок. Биопленки представляют собой сообщества микробов, а в некоторых случаях, и патогенных грибов, поддерживающие свой состав и расселяющиеся за счет клеток, периодически высвобождающихся и мигрирующих за пределы биопленки, образуя новые сообщества [3, 8, 12, 15].

Биопленка является предпочтительной формой существования бактерий — 99 % всех микроорганизмов на планете обитают в сообществах. Такая форма существования и наличие коммуникаций внутри сообщества обеспечивает им защиту и выживаемость при наличии неблагоприятных факторов окружающей среды [14].

Строение биопленок разных систематических групп бактерий принципиально одинаково. Объединение бактерий в биопленку происходит посредством экзоклеточного матрикса, основным компонентом которого являются экзополисахариды. В состав экзоклеточного матрикса также входят белки, липиды, нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). Экзополисахариды обладают протективными свойствами и препятствуют проникновению антибактериальных веществ внутрь организованной биопленки [19, 20, 10, 21, 18, 17].

Бактерии в биопленке находятся в тесной межклеточной коммуникации: при взаимодействии с раздражителем, продуцируют сигнальные молекулы (аутоиндукторы), которые регулируют их жизнедеятельность. С увеличением массы биопленки увеличивается и концентрация аутоиндукторов. При достижении определенной концентрации, аутоиндукторы связываются с рецепторами на поверхности клеточной стенки соседних бактерий (достижение кворума), активируют внутрибактериальные сигнальные пути, под действием которых меняется экспрессия определенных ге-

нов [4, 5]. Процесс такого информационного обмена бактериальных клеток между собой получил название «кворум сенсинг» (Quorum Sensing). Оно означает восприятие клетками изменения среды, которые наступают при достижении бактериальной культурой некоторой пороговой численности, и реакцию на эти изменения [13].

Вышеуказанные особенности строения и функции бактериальных биопленок определяют их устойчивость в отношении биоцидных препаратов, как отдельных бактерий в организованном сообществе, так и всей популяции в целом. Примером защитной функции экзополисахаридного матрикса (ЭПМ) является выживание *Salmonella typhimurium* и *Listeria monocytogenes* в биопленке при хлорировании. ЭПМ ограничивает диффузию хлора через поверхность биопленки внутрь, тем самым обеспечивая устойчивость бактерий к этому способу дезинфекции [16]. Гипохлорит-ионы также снижают свою активность за счет инактивации их матриксом в поверхностных слоях бактериальной пленки [6].

По результатам исследований некоторых зарубежных авторов, средства на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) оказались неэффективны против биопленок, образованных *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* даже в высоких концентрациях, поскольку отрицательно заряженные полисахариды ЭПМ способны связывать положительно заряженные молекулы ЧАС, и тем самым защищать биопленку от уничтожения [7]. Такой же механизм является причиной устойчивости микробных пленок к производным гуанидина и дезсредствам на основе фенольных соединений [22, 11]. Показано также, что средства на основе формальдегида, глутарового альдегида и ортофталевого альдегида оказались неэффективны против сформированных биологических пленок [12].

Таким образом, большинство используемых сейчас в практическом здравоохранении активностей веществ (АДВ) дезинфицирующих средств неэффективны в отношении биологических пленок.

В настоящее время дезинфицирующие средства на основе третичных алкиламинов получают широкое распространение, поскольку обладают биоцидной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе микобактерий туберкулеза, патогенных и плесневых грибов, вирусов, имея при этом низкие показатели токсичности.

Третичный алкиламин представляет собой асимметричную молекулу, состоящую из гидрофобной алифатической цепи ($R = C_{12}H_{25}$) и гидрофильных полярных групп $R-N(CH_2)_3NH_2$. Свободные аминогруппы и атомы третичного азота формируют щелочную среду, которая повышает антимикробную активность препарата.

Препараты на основе третичных алкиламинов отвечают всем требованиям, предъявляемых к современным дезинфицирующим препаратам, а именно: высоко стабильны, хорошо растворимы в воде, не повреждают обрабатываемую поверхность, обладают моющими свойствами и относятся к 4 классу малоопасных веществ.

В предыдущих исследованиях нами было показано, что третичные алкиламины оказывают тотальное повреждение субмикроскопической организации стафилококков и кишечной палочки, и после обработки препаратом прекращается рост бактерий.

Цель данного исследования — определить концентрации рабочих растворов дезинфицирующего средства на основе третичных алкиламинов, обеспечивающие полное подавление видимого роста клинических изолятов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* из образованных ими биопленок. С помощью электронно-микроскопических методов исследования определить характер и степень повреждений биопленок под действием разных концентраций препарата на основе третичных алкиламинов.

Материалы и методы. В исследовании были использованы клинические изоляты *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, полученные из ГУ здравоохранения г. Москвы ГКБ им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы.

Биоцидный препарат представлял собой концентрат третичных алкиламинов для приготовления рабочих растворов, АДВ N,N-бис(3-аминопропил)додециламин (5,0% в концентрате).

Формирование биопленки в условиях in vitro. Образцы биопленок для проведения исследования по воздействию препарата на основе третичных алкиламинов получали по методу O'Toole et al., 2000 [15].

Обработка биопленки препаратом на основе третичных алкиламинов. Для определения минимальных ингибирующих концентраций МИК

антимикробного препарата на основе третичных алкиламинов в отношении биопленок использовали микрометод серийных разведений в жидкой среде (Источник: Клиническая микробиология и микробная химиотерапия, 2004, т. 6, № 4, с. 306–359. Методические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам).

Препарат на основе третичных алкиламинов использовали в концентрациях 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 и 2,5% по АДВ.

В лунки со сформировавшимися биопленками *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* добавляли препарат на основе третичных алкиламинов в указанных выше концентрациях, и затем планшеты выдерживали при комнатной температуре без встряхивания в течение 1 ч. В качестве контроля служили биопленки бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, обработанные дистиллированной водой. После инкубации дезинфицирующее средство удаляли, образцы биопленок отмывали дистиллированной водой трижды, и после этого добавляли по 200 мкл свежей питательной среды LB, инкубировали при 37°C без встряхивания в течение 24 ч. Затем из инкубационной среды производили высеивание на агаризованную среду LB. Бактерии инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл исследуемого образца определяли путем посева на питательный агар 0,1 мл соответствующего разведения образца культуры и подсчета выросших колоний.

За минимальные ингибирующие концентрации (МИК) дезинфицирующего средства на основе третичных алкиламинов принимали концентрации, обеспечивающие полное подавление видимого роста клинических изолятов бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* из образованных биопленок на поверхности разных материалов (стекло и кремниевая подложка).

Сканирующая электронная микроскопия. Для исследования воздействия препарата на основе третичных алкиламинов на биопленки, образованные клиническими изолятами *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, были использованы образцы биопленок этих видов бактерий, выращенные на кремниевых подложках в питательном LB-бульоне в чашках Петри в течение 48 ч без встряхивания.

Опытные образцы биопленок обрабатывались препаратом на основе третичных алкиламинов в концентрациях 0,1, 0,25, 0,5 и 2,5% по АДВ в течение 1 ч без встряхивания. Более высокая концентрация дезинфицирующего средства (2,5%) в этой части исследования была выбрана для лучшей визуализации морфологических изменений в биопленке. Контрольные образцы в течение 1 ч находились в дистиллированной воде.

По завершении инкубации образцы биопленок были фиксированы по методу Ito-Karnovsky в течение 1 часа, отмыты дистиллированной

Показатели выживаемости бактерий в биопленках, обработанных различными концентрациями раствора на основе третичных алкиламинов

Бактерии \ С, % (по АДВ)	0,05	0,1	0,25	0,5	2,5	Контроль
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁹ КОЕ/мл	10 ⁸ КОЕ/мл	10 ² КОЕ/мл	0	0	10 ⁹ КОЕ/мл
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁸ КОЕ/мл	10 ⁶ КОЕ/мл	0	0	0	10 ⁹ КОЕ/мл

водой, напылены нанослоем золота толщиной 5 нм в напылительной установке (SPI Inc. USA). Далее препараты анализировались в двулучевом сканирующем электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company USA).

Результаты и обсуждение. Оценка антимикробной активности дезинфицирующих средств, как правило, проводится по традиционным микробиологическим методикам, в результате которых регистрируется способность микроорганизмов к росту на питательных средах после воздействия на них дезинфицирующего средства с нейтрализацией по истечении времени экспозиционной выдержки.

Применение традиционных микробиологических методов оценки биоцидной активности в отношении образуемых бактериями в неблагоприятных для них условиях биопленок неэффективно, поскольку ростовые свойства бактерий в составе биопленок могут быть изменены [1, 2]. По этой причине отсутствие роста бактерий из биопленок после их обработки дезинфицирующим средством нельзя считать критерием утраты ими жизнеспособности.

Кроме этого, микробиологическими методами не представляется возможным оценить действие дезинфицирующего средства на экзополитрикс биопленок, который препятствует проникновению активного биоцида внутрь и инактивирует его.

Использование микроскопических методов существенно расширяет возможности объективизации оценки действия биоцидных препаратов на микроорганизмы, поскольку при использовании этих методов визуализируется процесс ориентированного действия молекул биоцидного вещества на структурные компоненты, как бактерий, так и биопленок. О жизнеспособности обработанных дезинфицирующим средством бактерий можно судить по характеру и степени структурных изменений компонентов бактериальной клетки.

Для определения сохраненных жизнеспособных клеток в составе биопленок, после их обработки препаратом на основе третичных алкиламинов были поставлены опыты по воздействию дезинфицирующего средства непосредственно на биопленку. После отмыва-

ния биопленок от дезинфицирующего средства и добавления вновь питательного бульона, рост бульонной культуры возможен при условии сохранения ими ростовых свойств [1, 2].

После обработки препаратом на основе третичных алкиламинов предварительно образованных биопленок высевы, из питательного бульона спустя 24 ч роста продемонстрировали наличие в биопленках жизнеспособных бактерий — при концентрациях раствора меньше 0,5% для кишечной палочки, а для золотистого стафилококка меньше — 0,25% (табл.). Последующее увеличение концентрации дезинфицирующего средства приводило к прекращению роста бактерий.

Полученные данные позволяют говорить о том, что препарат способен проникать внутрь биопленки и оказывать бактерицидный эффект на бактерии, интегрированных в биопленку.

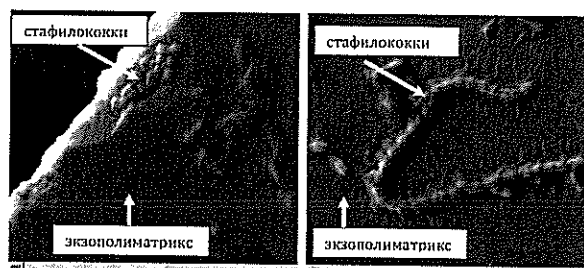


Рис. 1. Биопленка, образованная *St. aureus* (48 ч) на кремниевой подложке

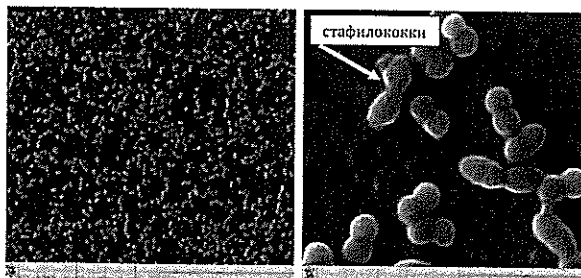


Рис. 2. Биопленка, образованная *St. aureus* (48 ч) на кремниевой подложке, обработанная 0,25% раствором средства на основе третичных алкиламинов в течение 60 мин

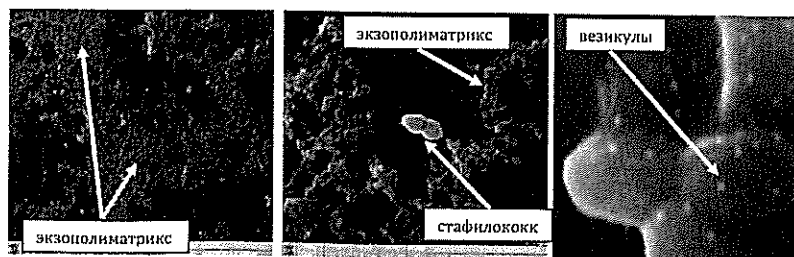


Рис. 3. Биопленка, образованная *St. aureus* (48 ч) на кремниевой подложке, обработанная 2,5% раствором средства на основе третичных алкиламинов в течение 60 мин

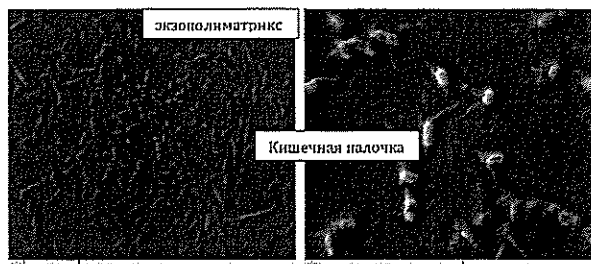


Рис. 4. Биопленка, образованная *E. coli* (48 ч) на кремниевой подложке

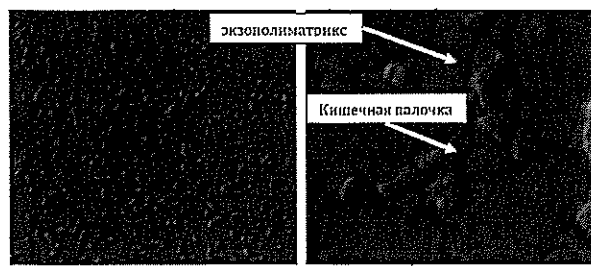


Рис. 5. Биопленка, образованная *E. coli* (48 ч) на кремниевой подложке, обработанная 0,5% раствором средства на основе третичных алкиламинов в течение 60 мин

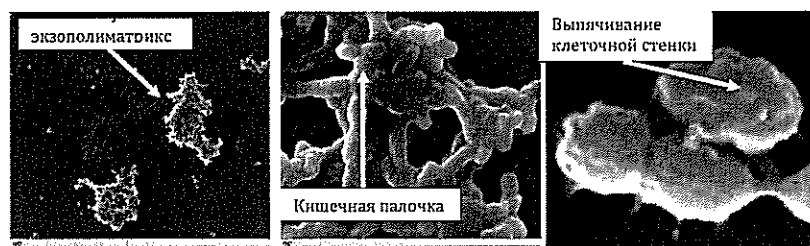


Рис. 6. Биопленка, образованная *E. coli* (48 ч) на кремниевой подложке, обработанная 2,5% раствором средства на основе третичных алкиламинов в течение 60 мин

Для уточнения характера воздействия препарата на основе третичных алкиламинов непосредственно на ЭПМ биопленки и структурную организацию бактерий внутри биопленки были проведены ультраструктурные исследования с использованием сканирующего электронного микроскопа нового поколения, позволяющего исследовать нативные необезвоженные препараты биопленок.

Возможность проведения такого исследования предотвращает возникновение артефактов, связанных с обязательной дегидратацией препаратов при стандартных методах исследования электронно-микроскопическими методами. Известно, что ЭПМ биопленок состоит из воды примерно на 90 %, поэтому для оценки его состояния после воздействия дезинфицирующих препаратов чрезвычайно важно сохранять его нативную структуру [1, 2].

Результаты исследования в сканирующем электронном микроскопе показали, что под действием препарата на основе третичных алкиламинов в концентрациях 0,25 % и 0,5 %, происходит грубая дезорганизация ЭПМ, в результате чего обнажается поверхность бактерий. На поверхности бактерий появлялись везикулы, а у кишеч-

ной палочки к тому же происходила деформация клеточной стенки (рис. 1–6). Поскольку бактерии остаются без покрова матриксом, они становятся уязвимыми для прямой атаки дезинфицирующего средства. Следует отметить, что имеет место прямая зависимость между повышением концентрации дезинфицирующего средства и дезорганизацией экзоклеточного матрикса.

Выводы. 1. Для оказания антибактериального эффекта на бактерии в составе биопленки необходимо существенное повышение концентрации препарата на основе третичных алкиламинов от 0,5 % и выше для *Escherichia coli* и от 0,25 % и выше для *Staphylococcus aureus*.

2. Препарат на основе третичных алкиламинов оказывает выраженный повреждающий эффект на экзополисахаридный матрикс биопленок и на бактерии внутри них. Разрушение бактерий внутри биопленок свидетельствует о преодолении дезинфицирующим средством на основе третичных алкиламинов протективного барьера, и является важным показателем биоцидной активности

третичных алкиламинов.

3. Совокупность полученных в исследовании данных по оценке антибактериальных свойств препарата на основе третичных алкиламинов позволяет рассматривать его в качестве дезинфицирующего средства для эффективной борьбы с биологическими пленками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Т.А. и др. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2006. — № 4. — С. 38–42.
2. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р. и др. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. 2010. — Т. 79. — № 4. — С. 435–446.
3. Тец В.В. Клеточные сообщества. — СПб., 1998. — С. 15–73.
4. Bauer W.D., Robinson J.B. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms // Curr. Opin. Biotechnol., 2002. — V. 13. — P. 234–237.
5. Bonaventura G.D., Spedicato L., D'antonio D. et al. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by quinolones, trimethoprim-Sulfamethoxazole and ceftazidime // Antimicrob. Agents chemother., 2004. — V. 48 (1). — P. 151–160.
6. Brown M.R.W., Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents // J. Appl. Microbiol., 1993. — V. 47. — P. 87–97.
7. Campanac C., Pineau L., Payard A. et al. Interaction between biocide cationic agents and bacterial biofilm // Antimicrob. Agents Chemother., 2002. — V. 46. — P. 1469–1474.

8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // *Sci.*, 1999. — V. 284. — P. 1318–1322.
9. Costerton W., Veeh R., Shirliff M. et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections // *Clin.*, 2003. — V. 112. — P. 1466–1477.
10. Discov D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents // *Nat Rev.*, 2003. — V. 2. — P. 114–122.
11. Gilbert P., Brown M.R. W. Influence of growth rate and nutrient limitation on the gross cellular composition of *Pseudomonas aeruginosa* and its resistance to 3- and 4-chlorophenol // *J. Bacteriol.*, 1978. — V. 133. — P. 1066–1072.
12. Gomes De Saravia S.G., Mele F.L. Non-invasive methods for monitoring biofilm growth on industrial water systems // *Latin Am. Appl. Res.*, 2003. — V. 33. — P. 353–359.
13. Greenberg E., Winans S. Fuqua quorum-sensing by bacteria // *Ann Rev Microbiol.*, 1996. — V. 50. — P. 727–751.
14. Lewis K. Riddle of biofilm resistance // *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001. — V. 45. — P. 999–1007.
15. O'toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development // *Ann. Rev. Microbiol.*, 2000. — V. 54. — P. 49–79.
16. Ronner A.B., Wong A.C.L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber // *Journal of Food Protection*, 1993. — V. 56. — P. 750–758.
17. Sponza D.T. Investigation of extracellular polymer substances (epS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions // *Enzyme Microb. technol.*, 2003. — V. 32. — P. 375–385.
18. Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework // *Microbiology*, 2001. — V. 147. — P. 3–9.
19. Tetz V.V., Rybalchenko O.V. Ultrastructure of colony-like communities of bacteria // *ApMiS*, 1997. — V. 105. — P. 99–107.
20. Tetz V.V., Rybalchenko O.V., Savkova G.A. Ultrastructure of surface film of bacterial colonies // *J. Gen. Microbiol.*, 1993. — V. 137. — P. 1081–1088.
21. Tetz V.V., Korobov V.P., Artemenko N.K. Extracellular phospholipids of isolated bacterial communities // *Biofilms*, 2004. — V. 1. — P. 149–155.
22. Wright N.E., Gilbert P. Influence of specific growth rate and nutrient limitation upon the sensitivity of *E. coli* towards chlorhexidine diacetate // *J. Appl. Bacteriol.*, 1987. — V. 62. — P. 309–314.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Диденко Любовь Васильевна – доктор биологических наук, зав. лабораторией анатомии микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18; служеб. тел.: (499) 193-30-40, e-mail: lyubov_didenko@mail.ru

Смирнова Татьяна Александровна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории анатомии микроорганизмов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

Толордава Этери Ромэовна – младший научный сотрудник лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

Зубашева Маргарита Владимировна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории анатомии микроорганизмов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

Куршин Дмитрий Александрович – генеральный директор ООО «ИНТЕРСЭН-плюс»

Кардаш Геннадий Григорьевич – кандидат химических наук, руководитель отдела инноваций ООО «ИНТЕРСЭН-плюс»

Емшанов Олег Владимирович – директор по научной работе ООО «ИНТЕРСЭН-плюс»

Автандилов Георгий Александрович – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник кафедры комплексного зубопротезирования МГМСУ им. А.И. Евдокимова

INFLUENCE OF TERTIARY ALKYLAMINES TO BIOFILMS, WHICH WERE CREATED BY ESCHERICHIA COLI AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS (BACTERIOLOGICAL AND ELECTRON MICROSCOPICAL INVESTIGATION)

L.V. Didenko¹, T.A. Smirnova¹, E.R. Tolordava¹, M.V. Zubasheva¹, G.G. Kardash², D.A. Kurshin², O.V. Emshanov², G.A. Avtandilov³

¹Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Academician N.F. Gamaleya: 18 Gamaleya str., Moscow, 123098, Russian Federation;

²INTERSEN-plus:

19 Silikatnaya str., Mytishi, Moscow region, 141004, Russian Federation;

³Moscow Government Medical-Stomatological University named after A.I. Evdokimov:

20, stroenie 1 Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russian Federation.

Didenko Lyubov' Vasil'evna – Doctor of Science in Biology, Head of Laboratory of Anatomy of Microorganisms in Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Academician N.F. Gamaleya; tel.: (499) 193-30-40, e-mail: lyubov_didenko@mail.ru

There was investigated influence of disinfectant wick base on tertiary alkylamines to biofilms, created by clinical isolates *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. There was investigated expressed deleterious effect on exo- polysaccharidic matrix of biofilms and bacterial breakdown inside it by raster electronic microscopy method. Preliminary concentration of means on the basis of tertiary alkylamines for rendering microbiocidal effect on a bacterium as a part of biofilms are defined.

Key words: disinfectants, biofilms, exo- polysaccharidic matrix, biofilm breakdown, tertiary alkylamines, disinfectants against biofilms.

REFERENCES

1. Romanova Yu.M., Alekseeva N.V., Smirnova T.A., Andreev A.L., Didenko L.V., Gintsburg A.L. Sposobnost' k formirovaniyu bioplenok v iskusstvennykh sistemakh u razlichnykh shtamov *Salmonella typhimurium* [Ability to formation of biofilms in artificial systems at various strains of *Salmonella typhimurium*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, 2006, no. 4, pp. 38–42.
2. Smirnova T.A., Didenko L.V., Azizbekyan R.R., Romanova Yu.M. Strukturno-funktsional'naya kharakteristika bakte-

- rial'nykh bioplenok [Structurally functional characteristic of bacterial biofilms]. *Mikrobiologiya*, 2010, vol. 79, no. 4, pp. 435-446.
3. Tets V.V. *Kletochnye soobshchestva* [Cellular communities]. St. Petersburg, 1998, pp. 15-73.
 4. Bauer W.D., Robinson J.B. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, vol. 13, pp. 234-237.
 5. Bonaventura G.D., Spedicato I., D'antonio D. et al. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by quinolones, trimethoprim-Sulfamethoxazole and ceftazidime. *Antimicrob. Agents chemother.*, 2004, vol. 48 (1), pp. 151-160.
 6. Brown M.R. W., Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.*, 1993, vol. 47, pp. 87-97.
 7. Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Moysset G., Roques C. Interaction between biocide cationic agents and bacterial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, pp. 1469-1474.
 8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Sci.*, 1999, vol. 284, pp. 1318-1322.
 9. Costerton W., Veeh R., Shirtliff M. et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *Clin.*, 2003, vol. 112, pp. 1466-1477.
 10. Discov D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev.*, 2003, vol. 2, pp. 114-122.
 11. Gilbert P., Brown M.R. W. Influence of growth rate and nutrient limitation on the gross cellular composition of *Pseudomonas aeruginosa* and its resistance to 3- and 4-chlorophenol. *J. Bacteriol.*, 1978, vol. 133, pp. 1066-1072.
 12. Gomes De Saravia S.G., Mele F.L. Non-invasive methods for monitoring biofilm growth on industrial water systems. *Latin Am. Appl. Res.*, 2003, vol. 33, pp. 353-359.
 13. Greenberg E., Winans S. Fuqua quorum-sensing by bacteria. *Ann Rev Microbiol.*, 1996, vol. 50, pp. 727-751.
 14. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, pp. 999-1007.
 15. O'toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2000, vol. 54, pp. 49-79.
 16. Ronner A.B., Wong A.C.L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. *Journal of Food Protection*, 1993, vol. 56, pp. 750-758.
 17. Sponza D.T. Investigation of extracellular polymer substances (epS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme Microb. technol.*, 2003, vol. 32, pp. 375-385.
 18. Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 2001, vol. 147, pp. 3-9.
 19. Tetz V.V., Rybalchenko O.V. Ultrastructure of colony-like communities of bacteria. *ApMiS*, 1997, vol. 105, pp. 99-107.
 20. Tetz V.V., Rybalchenko O.V., Savkova G.A. Ultrastructure of surface film of bacterial colonies. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, vol. 137, pp. 1081-1088.
 21. Tetz V.V., Korobov V.P., Artemenko N.K. Extracellular phospholipids of isolated bacterial communities. *Biofilms*. 2004, vol. 1, pp. 149-155.
 22. Wright N.E., Gilbert P. Influence of specific growth rate and nutrient limitation upon the sensitivity of *E. coli* towards chlorhexidine diacetate. *J. Appl. Bacteriol.*, 1987, vol. 62, pp. 309-314.



УДК 619:614.48

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ШЁРСТНО-ВОЛОСЯНОГО И ПЕРЬЕВОГО ПОКРОВОВ ЖИВОТНЫХ ОТ ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

Ю.О. Селянинов, И.Ю. Егорова, Е.М. Хрипунов

Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Российской академии сельскохозяйственных наук, Покров

При возникновении на территории фермерских животноводческих хозяйств и частных подворий инфекционных болезней, в том числе и особо опасных, некоторые из животных являются невосприимчивым к заболеванию, но в то же время способны выступать в роли механического переносчика патогена. Для предотвращения распространения инфекционных агентов такими животными необходимо иметь безопасный метод прижизненного обеззараживания поверхностных покровов животных. В экспериментах по отбору и испытанию пригодных для наших целей дезинфицирующих средств (ДС) использовали культуры тест-микроорганизмов 1-й и 2-й групп устойчивости (*Escherichia coli* штамм К-12 и *Staphylococcus aureus* штамм №209-Р). На основании скрининга ДС по показателям токсичности, бактериостатической и бактерицидной активности отобрано 5 препаратов из различных химических классов (окислители, галлоиды, третичные и четвертичные амины, полигуанидины). Дезинфицирующую активность выбранных биоцидов и режимы обеззараживания определяли на тест-объектах, представляющих собой фрагменты необработанных шкур пятнистого оленя, крупного рогатого скота (КРС), овцы, кабана, перьевого покрова перепелов, наиболее полно охватывающие спектр разнообразия шерстного покрова животных.

Установлено, что для прижизненного обеззараживания шерстно-волосяного и перьевого покровов животных от патогенной микрофлоры пригодны такие ДС, как электрохимически активированный гипохлорит натрия, Теотропин и Экоцид С. Использование этих ДС при обработке методами орошения и погружения (метод ванн), экспозиции 1 час, норме расхода 0,5-2,5 дм³/м² площади и 0,75-3,0 % по действующему веществу позволяет эффективно обеззаразить поверхностные покровы животных, загрязненные микроорганизмами 2 группы устойчивости к химическим ДС. Предложены способы прижизненного обеззараживания шерстно-волосяных/перьевых покровов основных экономически значимых видов гладко- и длинношерстных животных, а также птицы от патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, обеззараживание, дезинфицирующее средство, шерстно-волосяной покров.

Введение. В основе любых противоэпизоотических мероприятий значимое место занимает обез-

зараживание от патогена объектов ветеринарно-санитарного надзора с использованием различных