

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
ФГБУ «НИИЭМ
им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России



Синибулг А.Л.

« 05 » 08 2019 г.

М.П.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ ПО ДОГОВОРУ № 95-Т/19 от 27.06.2019 г.

«Исследование биологической активности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ в отношении легионелл и образуемых ими модельных биопленок»

Руководитель темы

И.С.Тартаковский

« 05 » 08 2019г.

Москва 2019г.

1. Список исполнителей

Руководитель темы
зав. лабораторией
д.б.н., профессор



И.С.Тартаковский

подпись, дата

Ведущий научный сотрудник
д.б.н.



Т.И. Карпова

подпись, дата

научный сотрудник



Т.А.Тарасова

подпись, дата

2.Реферат.

Настоящий отчет представлен в объеме 12 страниц; содержит 4 таблицы.

БИОЦИД, ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА, БИОПЛЕНКИ, ЛЕГИОНЕЛЛЫ

Цель данной работы - анализ эффективности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ в отношении планктонных форм и модельных моновидовых биопленок легионелл. В работе в модельных условиях изучали биологическую активность нового отечественного окисляющего биоцида, содержащего в качестве активных компонентов гипохлорит натрия, гидроксид натрия и бромид натрия, а также некоторые производные этих химических соединений, на планктонные формы и модельные моновидовые биопленки легионелл в сравнении с зарубежным аналогом.

Для исследования активности препаратов использовали 2 штамма легионелл *Legionella pneumophila*: штамм - Philadelphia 1, ATCC 33152 (США) и штамм, выделенный в Российской Федерации из градирни промышленного предприятия - Рухма-5. Тестирование штаммов легионелл на способность формировать биопленки проводили в плоскодонных пластиковых планшетах для иммуноферментного анализа. Для определения концентрации дезинфектанта, бактерицидной для культуры легионелл, полученной на агаровой среде, использовали метод серийных разведений. При исследовании биологической активности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ для сравнения использовали хлор и бром содержащий биоцид NALCO STABREX ST40, широко применяемый в промышленных градирнях и проточных системах охлаждения за рубежом, а также на некоторых предприятиях РФ и ЕАЭС. По результатам исследований можно сделать вывод о способности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ и биоцида STABREX ST-40 полностью подавлять способность легионелл к репродукции при различных формах существования (планктонные формы легионелл и моновидовые биопленки легионелл) в условиях эксперимента.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком уровне активности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ в отношении планктонных форм и биопленок легионелл, не уступающем импортному аналогу, а также соответствующим общепринятым международным и отечественным рекомендациям.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	Стр. 5
2. Основная часть	Стр. 6
2.1. Материалы и методы	Стр. 6
2.2. Результаты исследований.	Стр. 7
3. Заключение.	Стр. 10
4. Список использованных источников	Стр. 12

1. Введение.

Легионеллы широко распространены в природных водоемах, где они находятся в некультивируемом состоянии или паразитируют в амебах, не представляя существенной опасности для человека. В инженерно-технических сооружениях, связанных с циркуляцией воды, концентрация возбудителя резко возрастает за счет образования биопленок на поверхности оборудования, что является ключевым фактором накопления легионелл в потенциально опасных концентрациях и в сочетании с возможностью аэрогенного распространения создает угрозу здоровью людей.

К водным системам потенциально опасным в отношении распространения легионеллезной инфекции относят, прежде всего, системы охлаждения воды промышленных предприятий, централизованные системы кондиционирования воздуха с водным охлаждающим контуром, джакузи общественного пользования, системы горячего и холодного водоснабжения в диапазоне температур от 25° до 55°.

Высокую потенциальную опасность в отношении распространения легионелл представляют градирни, используемые для охлаждения технологического процесса на промышленных предприятиях. В процессе работы в градирнях циркулируют большие количества теплой воды и создаются благоприятные условия для размножения возбудителя и распространения аэрозоля, содержащего легионеллы в радиусе до 3 км. С 2006 по 2017гг. в мире были зарегистрированы 3642 эпидемические вспышки легионеллеза, из них связанные с градирнями или централизованными системами кондиционирования - 2083 вспышки. Микробиологический мониторинг потенциально опасных водных объектов в Свердловской области, проводившийся после эпидемической вспышки легионеллеза в Верхней Пышме подтвердил, что наряду с контаминацией систем горячего водоснабжения имеет место контаминация легионеллами воды градирен. За рубежом в начале 21 века введены количественные нормативы для легионелл в градирнях ($> 10^4$ КОЕ на литр), превышение которых представляет потенциальную биологическую опасность. В профилактических целях в градирнях регулярно проводят комплекс мероприятий, включающий применение дезинфекционных препаратов. В Российской Федерации применение дезинфектантов в градирнях для профилактики возможных вспышек легионеллеза не регламентировано, тем не менее, они применяются на металлургических предприятиях, как правило, в качестве средства, предотвращающего биологическое «заращение» воды, что в свою очередь необходимо для эффективного охлаждения технологического цикла.

Наибольшую опасность достижения эпидемически значимых концентраций легионелл является образование биопленок на поверхности систем водоснабжения, кондиционирования и увлажнения воздуха, иных инженерно-технических сооружений, связанных с циркуляцией воды. За последние годы за рубежом для борьбы с биопленками и контролем за ростом микроорганизмов в системах охлаждения наиболее широко применяют жидкие окисляющие биоциды на основе брома. Соответственно, импортные препараты данной группы применяют для борьбы с ростом микроорганизмов и легионелл, в частности, и в Российской Федерации и ЕАЭС. В этой связи представляет интерес анализ эффективности отечественного комплексного бромсодержащего препарата АКВА-СТАБРОМ в качестве возможности импортозамещения.

В данной работе в модельных условиях изучали биологическую активность нового отечественного окисляющего биоцида, содержащего в качестве активных компонентов гипохлорит натрия, гидроксид натрия и бромид натрия, а также некоторые производные этих химических соединений, на планктонные формы и модельные моновидовые биопленки легионелл в сравнении с зарубежным аналогом (STABREX ST-40).

2. Основная часть

Целью данной работы был анализ эффективности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ на планктонные формы и модельные моновидовые биопленки легионелл. Рекомендуемые производителем пределы концентраций для препарата АКВА-СТАБРОМ в промышленных условиях (циркуляционная вода) обычно находятся между 10 – 100 г/м³.

2.1. Материалы и методы

Для исследования из коллекции лаборатории были отобраны 2 штамма легионелл *Legionella pneumophila*: музейный штамм - L.p. Philadelphia 1, ATCC 33152 (США) и штамм, выделенный нами в Российской Федерации из градирни промышленного предприятия - Pyshma-5. Бактериальные культуры выращивали в протеозопептонном бульоне (Difco) или на агаре BCYE_α («Oxoid») с добавлением L-цистеина и водорастворимой формы пиродифосфата железа при 37⁰С в течение 72 ч. Тестирование штаммов легионелл на способность формировать биопленки проводили в плоскодонных пластиковых планшетах для иммуноферментного анализа. Выращенные в бульоне культуры тестируемых штаммов разводили свежей питательной средой 1:10. Полученные суспензии стерильно вносили по 150 мкл в лунки планшет (по 4 лунки для каждого

штамма). Для контроля фона также в 4 лунки вносили питательную среду, в которой инкубировали культуры. Планшет помещали в термостат на 96ч (при температуре 28°C) для подращивания. Оптическую плотность выросших планктонных клеток определяли на фотометре iEMS Reader MF «Labsystems» (Швеция) при длине волны 540 нм. Затем содержимое лунок осторожно удаляли и вносили по 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1% спиртового раствора кристалл виолета. Планшеты инкубировали при комнатной температуре (20°C) в течение 45 мин. Затем краситель осторожно удаляли и промывали лунки дважды дистиллированной водой. В отмытые от несвязавшейся краски лунки вносили по 200 мкл этилового спирта и оставляли на 45 мин при комнатной температуре. Интенсивность окрашивания спирта в лунках планшеты оценивали на фотометре при длине волны 540 нм.

Для определения концентрации дезинфектанта, бактерицидной для культуры легионелл, полученной на агаровой среде, использовали метод серийных разведений. При изучении действия препарата АКВА-СТАБРОМ на планктонные формы легионелл использовали концентрации 7,5 мг/л, 15 мг/л и 30 мг/л при времени контакта 15 минут, 30 минут, 60 минут и 7 дней (Таблица 1). Для изучения действия препарата на модельные моновидовые биопленки легионелл применяли концентрации 15 мг/л и 30 мг/л при времени контакта 60 минут, 24ч., 72ч. и 7 дней (Таблица 2).

При исследовании биологической активности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ в качестве сравнения использовали хлор и бром содержащий биоцид NALCO STABREX ST40, применяемый в промышленных градирнях и прямоточных системах охлаждения. Рекомендуемая производителем концентрация препарата STABREX ST40 в промышленных условиях – 30мг препарата на 1л воды.

Для определения концентрации дезинфектанта, бактерицидной для культуры легионелл, полученной на агаровой среде, использовали метод серийных разведений. При изучении действия препарата STABREX ST40 на планктонные формы легионелл использовали концентрации 7,5мг/л; 15мг/л и 30мг/л при времени контакта 15 минут, 30 минут, 60 минут и 7 дней (результаты в Таблице 3). Для изучения действия препарата на биопленки легионелл применяли концентрации 15мг/л и 30мг/л при времени контакта 60 минут, 24ч., 72ч. и 7 дней (результаты в Таблице 4).

2.2. Результаты исследований.

Полученные результаты свидетельствуют о различиях в концентрации препарата, необходимой для гибели планктонных форм клеток в зависимости от исходного разведения культуры. Так, для биоцида АКВА-СТАБРОМ при концентрации легионелл

10^3 КОЕ/мл минимальная бактерицидная концентрация рабочего раствора (по препарату %) составила 15 мг/л при времени контакта 15 минут, а при концентрации легионелл 10^7 КОЕ/мл - 30 мг/л при времени контакта 30 минут (табл.1).

Для разрушения биопленок легионелл эффективна концентрация препарата 30 мг/л, но время контакта существенно увеличилось – 24 часа (табл.2).

Таблица 1

Действие препарата АКВА-СТАБРОМ на планктонные формы легионелл.

Legionella pneumophila	Время контакта											
	15 минут			30 минут			60 минут			7 дней		
	7,5 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	7,5 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	7,5 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	7,5 мг/л	15 мг/л	30 мг/л
Штамм												
Philadelphia 1												
10^7 КОЕ/мл	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
10^5 КОЕ/мл	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^3 КОЕ/мл	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyshma-5												
10^7 КОЕ/мл	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
10^5 КОЕ/мл	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^3 КОЕ/мл	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

«+» - наличие роста культуры

«-» - отсутствие роста культуры

Таблица 2

Действие препарата АКВА-СТАБРОМ на биопленки легионелл.

Legionella pneumophila	Время контакта							
	1 час		24 часа		72 часа		7 суток	
	15 мг/л	30 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	15 мг/л	30 мг/л
Штамм								

Philadelphia 1	+	+	-	-	-	-	-	-
Pyshma-5	+	+	+	-	-	-	-	-

«+» - наличие роста культуры

«-» - отсутствие роста культуры

Для препарата STABREX ST-40 при концентрации легионелл 10^3 КОЕ/мл минимальная бактерицидная концентрация рабочего раствора (по препарату %) также составила 15 мг/л при времени контакта 30 минут, а при концентрации легионелл 10^7 КОЕ/мл – потребовалось 30 мг/л при времени контакта 30 минут (Таблица 1). Для разрушения биопленок легионелл эффективна концентрация препарата 30мг/л; при увеличении времени контакта до 24 часов (табл.2).

Действие препарата STABREX ST-40 на планктонные формы легионелл.

Таблица 3

Штамм <i>Legionella pneumophila</i>	Время контакта											
	15 минут			30 минут			60 минут			7 дней		
	7,5 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	7,5 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	7,5 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	7,5 мг/л	15 мг/л	30 мг/л
Philadelphia 1 10^7 КОЕ/мл	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
10^5 КОЕ/мл	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^3 КОЕ/мл	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyshma-5 10^7 КОЕ/мл	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
10^5 КОЕ/мл	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10^3 КОЕ/мл	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

«+» - наличие роста культуры

«-» - отсутствие роста культуры

Таблица 4

Действие препарата STABREX ST-40 на биопленки легионелл.

Штамм <i>Legionella pneumophila</i>	Время контакта							
	1 час		24 часа		72 часа		7 суток	
	15 мг/л	30 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	15 мг/л	30 мг/л	15 мг/л	30 мг/л
Philadelphia 1	+	+	-	-	-	-	-	-
Pyshma-5	+	+	+	-	-	-	-	-

«+» - наличие роста культуры

«-» - отсутствие роста культуры

Для обоих использовавшихся в работе штаммов легионелл определены бактерицидные концентрации, действующие на планктонные формы и биопленки легионелл. Показано, что выделенный в России штамм Pyshma 5 обладает более высокой устойчивостью к действию препаратов АКВА-СТАБРОМ и STABREX ST-40 по сравнению с музейным штаммом Philadelphia 1.

По результатам исследований можно сделать вывод о способности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ и биоцида STABREX ST-40 полностью подавлять способность легионелл к репродукции при различных формах существования (планктонные формы легионелл и моновидовые биопленки легионелл) в условиях эксперимента в концентрациях, соответствующих рекомендациям производителя. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком уровне активности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ, не уступающего по активности импортному STABREX ST-40, в отношении планктонных форм и биопленок легионелл, соответствующим общепринятым международным и отечественным рекомендациям.

3. Заключение.

В исследованиях проведена оценка эффективности нового отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ на легионеллы в модельных условиях (планктонные формы и моновидовые биопленки легионелл). При применении препарата АКВА-СТАБРОМ с

концентрацией легионелл 10^3 КОЕ/мл минимальная бактерицидная концентрация рабочего раствора (по препарату %) составила 15 мг/л при времени контакта 15 минут, а с концентрацией легионелл 10^7 КОЕ/мл – 30 мг/л при времени контакта 60 минут. Для разрушения биопленок легионелл эффективна концентрация препарата 30 мг/л при времени контакта 24 часа.

В качестве препарата сравнения использовали зарубежный бромсодержащий биоцид STABREX ST-40 (Налко, Нидерланды). По результатам исследований можно сделать вывод о способности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ и биоцида STABREX ST-40 полностью подавлять способность легионелл к репродукции при различных формах существования (планктонные формы легионелл и моновидовые биопленки легионелл) в условиях эксперимента.

Полученные результаты свидетельствуют о достаточно высоком уровне активности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ в отношении планктонных форм и биопленок легионелл, соответствующим общепринятым международным и отечественным рекомендациям. По результатам экспериментальных исследований данный препарат может быть рекомендован в качестве импортозамещения для применения в промышленных водных охлаждающих систем с целью профилактики легионеллеза.

4. Список литературы.

- 1.Тартаковский И.С., Карпова Т.И., Груздева О.А., Мариненко О.В., Дронина Ю.Е. Влияние температуры на жизнеспособность планктонных клеток и модельных биопленок *Legionella pneumophila* в воде. Журн.микробиол.2015 ,5, 7-12.
- 2.Дронина Ю.Е., Пантелеева Л.Г., Карпова Т.И., Шустрова Н.М., Романова Ю.М., Тартаковский И.С., Шандала М.Г., Гинцбург А.Л. Оценка бактерицидной активности дезинфицирующих средств против легионелл на модели биопленок. Журн.микробиол.2008 ,2, 117-119.
3. Тартаковский И.С., Груздева О.А., Карпова Т.И., Дронина Ю.Е., Тарасова Т.А., Логинова О.Г., Дмитриева М.Н. Анализ эффективности различных методических подходов, направленных на элиминацию планктонных клеток и биопленок легионелл в потенциально опасных водных системах. Журн.микробиол.2018 ,4, 119-124.
4. СПЗ.1.2.2626-10 «Профилактика легионеллеза» 2010г.
5. МУК 4.2.2217- 07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды» 2007.
6. М.Г.Шандала, И.С.Тартаковский, Л.Г.Пантелеева, Ю.В.Демина, Т.И.Карпова, Ю.Е.Дронина, И.В.Новокшонова, А.Л.Гинцбург Опыт применения дезинфицирующих средств в градирнях промышленного предприятия для профилактики легионеллеза. Журн. Дез.дело №1, 2010, 50-54.
7. Карпова Т.И., Дронина Ю.Е., Алексеева Н.В. и др. Формирование биопленок *Legionella spp.* в эксперименте. Журн.микробиол., 2008, 1:3-7.
8. Legionella and prevention of Legionellosis. Ed. by J.Bartram. WHO, 2007.
9. AltotkmanyLobna, Nordal Bo., Overview of Legionella infection control and treatment methods. Effstock 2009:3-12.
10. Hamilton K.A., Prussin A.J., Ahmed W., Haas C.N. Outbreaks of Legionnaires Disease and Pontiac Fever 2006-2017. Current Environmental Health Reports, 2018, 5: 263-271

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Минздрава России

Гинзбург А.Л.



М.П.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПО ИССЛЕДОВАНИЮ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОТЕЧЕСТВЕННОГО БИОЦИДА АКВА-СТАБРОМ НА ЛЕГИОНЕЛЛЫ И ОБРАЗУЕМЫЕ ИМИ МОДЕЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ.

Настоящий акт составлен в том, что в соответствии с договором № 95-Т/19 от 27.06.2019г. были проведены исследования по изучению биологической активности отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ на планктонные формы и моновидовые биопленки легионелл на экспериментальных моделях. Полученные результаты показали эффективность действия отечественного биоцида АКВА-СТАБРОМ на планктонные формы и биопленки легионелл в условиях эксперимента, также как и продукта-аналога, биоцида NALCO STABREX ST40. Препарат может быть рекомендован для профилактики легионеллеза в промышленных водных охлаждающих системах и других потенциально опасных водных системах.

Руководитель темы
зав. лабораторией
д.б.н., профессор

И.С.Тартаковский