

УТВЕРЖДАЮ

Директор

ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии

Роспотребнадзора  
академии РАН, профессор

В.Г. Акимкин



Отчет о проведении научно-исследовательской работы:

**«Исследование активности импульсного УФ излучения сплошного спектра в отношении биологических плёнок условно-патогенных микроорганизмов»**

**Цель исследований:** Определение условий разрушения биологических пленок грамотрицательных и грамположительных условно-патогенных микроорганизмов на абиотических тест-объектах радиационными потоками импульсного ультрафиолетового излучения сплошного спектра.

**Задачи исследований:**

1. Экспериментально подтвердить возможность эффективного разрушения биопленок на поверхности с помощью импульсного УФ излучения сплошного спектра.
2. Определить требуемые для разрушения биопленок энергетические дозы УФ излучения сплошного спектра.
3. Определить условия применения импульсных УФ установок для разрушения биопленок и эффективной инактивации микроорганизмов.

**Материалы и методы исследования**

**Место проведения исследований.** ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Исследования выполнены в соответствии с договором № 20/17 от 26 декабря 2017 г. Сроки проведения: январь 2018 г. - август 2018 г.

**Оборудование:** Исследования проводили на лабораторном макете установки, представляющим собой закрытый бокс, внутри которого располагали импульсную ксеноновую лампу (Рисунок 1) и облучаемые тест-объекты.

Импульсная ксеноновая лампа располагается на высоте 20 см от держателя, обеспечивающего точное позиционирование с испытуемыми тест-объектами относительно источника излучения. Для предотвращения возможного повышенного нагрева тест-объектов при длительном их облучении в боковых стенках корпуса бокса были расположены вентиляторы. Блок питания и управления импульсной ксеноновой лампы был реализован в отдельном корпусе на основе серийной импульсной УФ установки «Альфа-05».

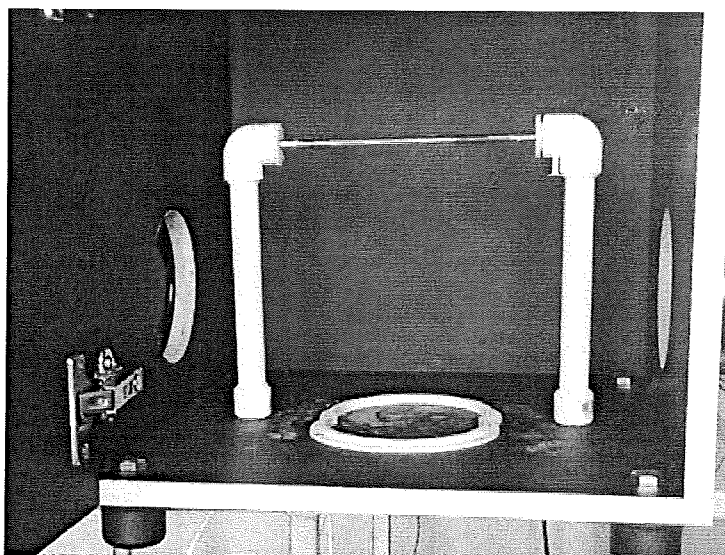


Рисунок 1 - Лабораторный макет установки

1 – импульсная ксеноновая лампа

Источником ультрафиолетового излучения сплошного спектра являлась импульсная ксеноновая лампа трубчатого типа, с внутренним диаметром кварцевой колбы 5 мм и межэлектродным расстоянием 120 мм. Средняя электрическая мощность лампы составляла 200 Вт и генерировала вспышки света с частотой 3,3 Гц. Спектр излучения (рисунок 2) сплошной с наложением одиночных линий, а спектральное распределение энергии излучение соответствуют излучателю черного тела с температурой 8000К.

Радиационные характеристики ксеноновой лампы измерялись по методике взаимной калибровки между калиброванным фотоприемником UV Sensor «TOCON-probe», регистрирующим излучение в диапазоне от 220 до 275 нм с максимумом чувствительности на 255 нм и оптоволоконным спектрометром просветленного типа с высокой чувствительностью в ультрафиолетовом диапазоне AvaSpec-ULS2048-USB2.

Измерительные приборы устанавливали напротив оси лампы на расстоянии 250 см. Регистрируемый сигнал со спектрометра выводили на ноутбук со специальным программным обеспечением «Avantes», сигнал с датчика UV Sensor «TOCON-probe» выводили на пишущий цифровой осциллограф TDS-2004C.

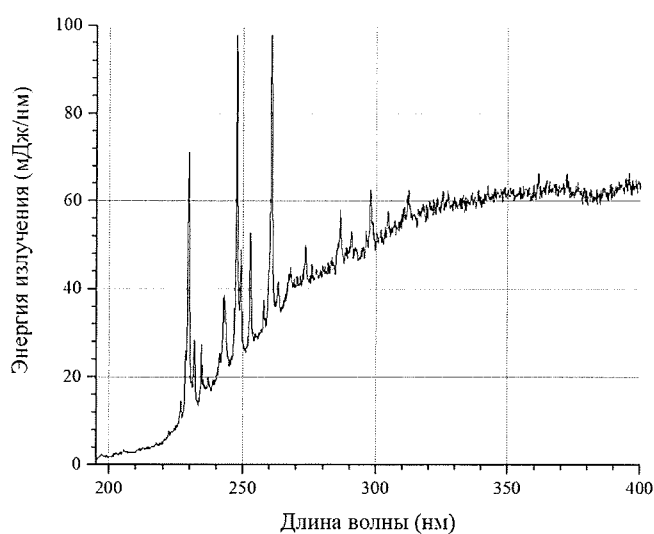


Рисунок 2 - Спектр излучения импульсной ксеноновой лампы

Интегрирование полученного спектра излучения позволяет получить энергию излучения лампы в необходимом спектральном диапазоне:

- 200-230 нм – 0,2 Дж;
- 200-300 нм – 2,8 Дж;
- 200-400 нм – 8,8 Дж.

Распределение дозы на поверхности чашки Петри рассчитывали по стандартной методике (Григорьев Б.А. Импульсный нагрев излучениями. Москва: Наука, 1974).

Результаты расчетов по вышеприведенной методике представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Облученность поверхности тест-объекта импульсной ксеноновой лампой.

$\lambda$ , нм	Энергия излучения за 1 импульс, Дж	Расстояние от поверхности раствора до оси источника, см	Доза за 1 импульс, мДж/см <sup>2</sup>
200-230	0,2	20	0,048
200-300	2,8		0,67
200-400	8,8		2,1

В качестве **тест-объектов** использовали биологические пленки, образованные штаммами *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 и *Staphylococcus aureus* 906.

**Тест-поверхности:** металлические пластины размером 10x10 мм, изготовленные из нержавеющей стали.

**Методика исследования эффективности УФ установки в отношении деструкции биологических пленок.**

Биопленки получали методом культивирования (выращивания) суточных культур, исследуемых в данной работе штаммов, разведенных до концентрации 0,5 Ед по McFarland, на стерильных металлических пластинах 10x10 мм, погруженных в чашку Петри с 15 мл ЛБ, при 37<sup>0</sup>С на термокачалке (*Pseudomonas aeruginosa* – 24 ч., *Staphylococcus aureus* – 48 ч).

Пластины с образовавшимися биологическими пленками помещали в одноразовую чашку Петри и последовательно облучали сначала одну сторону пластины, потом образец переворачивали и повторяли цикл УФ воздействия. Облучение проводили в изолированном боксе, описанным выше. Тест-объект (металлическая пластина с биопленкой) располагали по центру под источником излучения (рисунок 1). Расстояние до источника излучения 20 см. Взаимное расположение источника излучения и образцов во время облучения оставалось неизменным, как при проведении отдельного опыта, так и в разных опытах.

Инкубирование облученных тест-объектов проводили в чашках Петри в 15 мл ЛБ и 15 мл ЛА при 37<sup>0</sup>С, 24ч и 48ч, для разных штаммов соответственно. После инкубации бульон с планктонной культурой удаляли, чашки Петри с пластинами промывали дистиллированной водой. Затем половину образцов биопленки элюировали с тест-поверхности 0,1% спиртовым раствором генциана фиолетового и определяли оптическую плотность полученного окрашенного раствора на фотометре Multiskan FC при длине волны 492 нм. По разнице оптической плотности окрашенных растворов элюированных биопленок, подвергшихся и не подвергшихся облучению, судили об эффективности деструктивного действия высокоинтенсивного УФ-излучения сплошного спектра, генерируемого импульсной ксеноновой лампой, в отношении биопленок грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов при заданном времени облучения.

Другую половину биопленок снимали с тест-поверхности путем инкубации тест-объекта на мешалке типа «Вортекс» в пробирках с дистиллированной водой и стеклянными бусами при комнатной температуре в течение 2 минут, далее, содержимое пробирки высевали глубинным методом на плотную питательную среду ЛА и через 24 - 72 часа проводили подсчет жизнеспособных клеток (КОЕх10<sup>n</sup>).

### **Этапы исследования.**

Исследование состояло из нескольких последовательно осуществленных несвязанных между собой этапов:

**1 этап.** Экспериментальное подтверждение возможности эффективного разрушения биопленок на поверхности с помощью импульсного УФ излучения сплошного спектра и определения требуемой для разрушения биопленок энергетические дозы импульсного УФ излучения сплошного спектра. Последовательность выполнения: культивирование (выращивание) биологических пленок на металлических пластинках и последующее их облучение импульсной УФ-установкой во временном интервале от 1 минуты до 32 минут (1,2,4,8,16,20,24,28,32 минуты).

2 и 3 этапы проводились с целью определения условий применения импульсных УФ установок для эффективной инактивации штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 и деструкции биопленок.

**2 этап.** Последовательность выполнения: а) культивирование (выращивание) биологических пленок штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 на металлических пластинках; б) воздействие на тест-поверхности 0,5% рабочим раствором дезинфицирующего средства, содержащим третичный амин, ингибиторы коррозии, поверхностно активные вещества, в течении 30 минут в соответствии с режимами, рекомендованными в инструкции по применению для обработки поверхностей); в) дальнейшее облучение тест-поверхностей импульсной УФ-установкой во временном интервале от 1 минуты до 5 минут (1,2,3,4,5 минут).

**3 этап.** Последовательность выполнения: а) культивирование (выращивание) биологических пленок штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 на металлических пластинках; б) облучение тест-поверхностей импульсной УФ-установкой во временном интервале от 1 минуты до 5 минут (1,2,3,4,5 минут); в) последующая обработка тест-поверхностей 0,5%

рабочим раствором дезинфицирующего средства, содержащим третичный амин, ингибиторы коррозии, поверхностно активные вещества, в течении 30 минут в соответствии с режимами, рекомендованными в инструкции по применению для обработки поверхностей.

В качестве контрольных групп служили интактные тест-поверхности с отсутствием тест-культуры (холостая группа), облучения ее импульсным УФ излучением сплошного спектра (Контроль 1), обработанные в течении 30 мин дезинфицирующим средством (Контроль 2).

### Полученные результаты

Бактерицидная активность импульсного УФ излучения сплошного спектра в отношении 2 видов биопленок коллекционных штаммов представлена в таблицах 2 и 3. Деструкцию биопленок наблюдали уже после 1 минуты воздействия импульсного УФ излучения сплошного спектра. При возрастании экспозиции облучения значения оптической плотности растворенной биопленки статистически достоверно не менялось. Возможно, за первую минуту облучения в результате поглощения излучения происходят все значимые фотохимические превращения, влияющие на оптическую плотность»

Таблица 2. Динамика оптической плотности биопленки коллекционного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 при воздействии импульсного УФ излучения сплошного спектра в различные временные интервалы

Холостая проба (пластины без культуры)	Контроль 1 (образец без облучения)	Время воздействия импульсной УФ-установки, мин				
		1	2	4	8	16
0,040± 0,0005	0,113± 0,004	0,083 0,001*	0,080± 0,002*	0,089± 0,004*	0,085± 0,002*	0,086± 0,003*
Время воздействия импульсной УФ-установки, мин						

20	24	28	32
0,084±0,002*	0,080±0,005*	0,083±0,003*	0,072±0,003*

Примечание: данные представлены в единицах оптической плотности окрашенного раствора элюированных биологических пленок, измеренной при длине волны 492 нм.

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем;  $M \pm m$ ,  $n$  (количество повторов) = 36.

**Таблица 3.** Динамика оптической плотности биопленки коллекционного штамма *Staphylococcus aureus* (штамм 906) при воздействии импульсного УФ излучения сплошного спектра в различные временные интервалы

Холостая проба (пластины без культуры)	Контроль 1 (образец без облучения)	Время воздействия импульсной УФ-установки, мин				
		1	2	4	8	16
0,040±0,0004	0,087±0,003	0,076±0,001*	0,085±0,002	0,085±0,003	0,085±0,002	0,075±0,002*
Время воздействия импульсной УФ-установки, мин						
20	24	28	32			
0,070±0,003*	0,071±0,003*	0,070±0,003*	0,076±0,003*			

Примечание: данные представлены в единицах оптической плотности окрашенного раствора элюированных биологических пленок, измеренной при длине волны 492 нм.

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем;  $M \pm m$ ,  $n$  (количество повторов) = 36.

В ходе экспериментов не было обнаружено существенного изменения экстинкции в зависимости от времени воздействия потоками импульсного УФ излучения, поэтому увеличение времени экспозиции в интервале времени более 30 минут считали нецелесообразным. Минимальное время воздействия импульсного УФ излучения на биопленку, вызывающее ее деструкцию, составило 1 минуту.

При этом инактивация обоих тест-штаммов, в отличие от деструктивных процессов, достоверно наступала уже после 1 минуты



облучения, полностью исчезая в экспериментальных группах, начиная с 2 минуты воздействия импульсной УФ-установки (Таблицы 4 и 5).

**Таблица 4.** Динамика роста жизнеспособных бактерий биопленки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 при воздействии импульсного УФ излучения сплошного спектра в различные временные интервалы

Холостая проба (пластины без культуры)	Контроль 1 (образец без облучения)	Время воздействия импульсной УФ-установки, мин				
		1	2	4	8	16
0	$3,6 \times 10^5 \pm 9833$	$8,2 \times 10^3 \pm 953^*$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Время воздействия импульсной УФ-установки, мин						
20	24	28		32		
Нет роста	Нет роста	Нет роста		Нет роста		

Примечание: Данные представлены в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ).

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем;  $M \pm m$ , n (количество повторов) = 4.

**Таблица 5.** Динамика роста жизнеспособных бактерий биопленки *Staphylococcus aureus* (штамм 906) при воздействии импульсного УФ излучения сплошного спектра в различные временные интервалы

Холостая проба (пластины без культуры)	Контроль 1 (образец без облучения)	Время воздействия импульсной УФ-установки, мин				
		1	2	4	8	16
0	$1,5 \times 10^5 \pm 11417$	$2,1 \times 10^3 \pm 794^*$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Время воздействия импульсной УФ-установки, мин						
20	24	28		32		
Нет роста	Нет роста	Нет роста		Нет роста		

Примечание: Данные представлены в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ).

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем;  $M \pm m$ ,  $n$  (количество повторов) = 4.

Результаты опытов свидетельствуют о высокой бактерицидной активности импульсного УФ излучения, прежде всего, на жизнеспособность бактериальных клеток, находящихся в составе биопленок (отсутствие роста бактерий, начиная со 2 минуты облучения).

Результаты исследований на 2 и 3 этапах представлены в таблицах 6 и 7.

**Таблица 6** Динамика оптической плотности биопленки коллекционного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 при воздействии дезинфицирующего средства с последующим облучением тест-поверхностей импульсным УФ излучением сплошного спектра в различные временные интервалы

Холостая проба (металл без культуры)		0,050±0,002
<b>Контроль I</b> (биопленку не подвергали воздействию)		0,101±0,002
<b>Контроль II</b> (Д/С, 0,5% - 30 мин)		0,092±0,002*
Импульсное УФО, 1 мин	-	<b>0,081±0,002***</b>
	Д/С	<b>0,075±0,003***</b>
Импульсное УФО, 2 мин	-	0,100±0,001**
	Д/С	0,080±0,001***
Импульсное УФО, 3 мин	-	0,090±0,002**
	Д/С	0,110±0,002***
Импульсное УФО, 4 мин	-	0,098±0,003
	Д/С	0,091±0,003*
Импульсное УФО, 5 мин	-	0,102±0,003**
	Д/С	0,101±0,004

Примечание:  $n$  (кол-во повторов) = 12; Д/С – дезинфицирующее средство; \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем I; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем II; \*\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем I и II

**Таблица 7.** Динамика оптической плотности биопленки коллекционного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 при облучении тест-поверхностей импульсным УФ излучением сплошного спектра в различные

временные интервалы с последующим воздействием дезинфицирующего средства

Холостая проба (металл без культуры)		0,050±0,002
<b>Контроль I</b> (биоленку не подвергали воздействию)		0,101±0,002
<b>Контроль II</b> (Д/С, 0,5% - 30 мин)		0,092±0,002*
Импульсное УФО, 1 мин	-	<b>0,084±0,001***</b>
	Д/С	<b>0,084±0,001***</b>
Импульсное УФО, 2 мин	-	0,094±0,002*
	Д/С	0,066±0,002****
Импульсное УФО, 3 мин	-	0,099±0,002**
	Д/С	0,070±0,002****
Импульсное УФО, 4 мин	-	0,101±0,003**
	Д/С	<b>0,051±0,002****</b>
Импульсное УФО, 5 мин	-	0,099±0,004
	Д/С	<b>0,050±0,001****</b>

Примечание: \*\*\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с образцом, подвергнутым только воздействию импульсной УФ-установкой.

Примечание: n (кол-во повторов) = 12; Д/С – дезинфицирующее средство; \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем I; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем II; \*\*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем I и II

Результаты исследований на 2 этапе показывают снижение оптической плотности раствора облучаемой импульсным УФ излучением биоленки уже через 1 минуту воздействия, что согласуется с данными, полученными ранее (Табл. 2).

Результаты исследований также показывают, что при предварительной обработке тест-объектов дезинфицирующим средством с последующим их УФ облучением было достигнуто более значимое снижение оптической плотности биоленки по сравнению с обработкой тест-объекта только дезинфицирующим средством.

Результаты исследований на 3 этапе также показали снижение оптической плотности раствора биоленки уже после 1 минуты облучения.

Однако, в отличие от схемы экспериментов на 2 этапе, начиная с 4 минут предварительного облучения тест-объекта импульсной ксеноновой лампой, было достигнуто более значимое снижение оптической плотности биопленки ( $0,051 \pm 0,02$  в сравнении с  $0,098 \pm 0,03$ ) (Таблица 7).

Полученные данные свидетельствуют, что высокоинтенсивное импульсное ультрафиолетовое излучение сплошного спектра, генерируемое ксеноновой лампой, вероятно инициировало фотоокислительные процессы в матриксе (гликокаликсе) биологических пленок, вследствие чего произошло снижение барьерных функций матрикса, что, в свою очередь, позволило дезинфицирующему средству напрямую воздействовать на клетки бактерий биопленки в течение всего времени экспозиции.

### Заключение

1. Результаты исследований показали, что ультрафиолетовое излучение сплошного спектра, генерируемое импульсной ксеноновой лампой, является высокоэффективным средством инактивации штаммов *Staphylococcus aureus* (штамм 906) и *Pseudomonas aeruginosa* (штамм ATCC 15442), образующих биологические пленки, и деструкции матрикса биологической пленки. При этом показано, что полная инактивация исследованных штаммов, наблюдается без разрушения матрикса биопленки. То есть импульсное УФ излучение проникает через защитные структуры биологических пленок и инактивирует, находящиеся под ними, колонии микроорганизмов.

2. Определена минимальная энергетическая доза импульсного УФ излучения сплошного спектра, обеспечивающая полную (100%) инактивацию бактериальных клеток при исходной контаминации  $10^5$  КОЕ, которая составляет  $0,25$  Дж/см<sup>2</sup> в спектральном диапазоне 200 – 300 нм.

3. Использование импульсного ультрафиолетового излучения сплошного спектра с энергетической дозой более  $0,5$  Дж/см<sup>2</sup> с последующей обработкой тест-поверхностей комплексным химическим дезинфицирующим средством (используемым в соответствии с инструкцией по применению)

приводит к разрушению биопленки и одновременной инаktivации входящих в ее состав бактериальных клеток.

### **Практические рекомендации.**

При проведении в помещениях медицинских организаций дезинфекционных мероприятий по обеззараживанию на поверхностях бактериальных биологических пленок, рекомендуется применение импульсных ультрафиолетовых установок, позволяющих одновременно снижать барьерные свойства биологических пленок и с высокой эффективностью инаktivировать входящие в их состав бактерии.

Для усиления эффективности удаления с поверхностей помещений биологических пленок с помощью химических дезинфекционных средств рекомендуется использовать следующий алгоритм их обработки: вначале поверхности облучаются импульсными ультрафиолетовыми установками, обеспечивающими инаktivацию бактерий в дозе не менее 0,5 Дж/см<sup>2</sup>, затем проводится их повторная обработка химическими дезинфицирующими средствами по режимам, эффективным в отношении объектов, загрязненных биологическим материалом.

Зав. лабораторией  
инфекций, связанных с оказанием  
медицинской помощи, чл.-корр. РАН, д.м.н.



**А.В. Тутельян**

Мл. научный сотрудник  
лаборатории инфекций, связанных  
с оказанием медицинской помощи



**Н.Г. Седых**