

Методы борьбы с биологическими пленками на пищевых производствах

Академик РАН, д-р мед. наук **А.В.ТУТЕЛЬЯН**

ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Д-р биол. наук **Ю.М.РОМАНОВА**

НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи

Канд. техн. наук **Б.В.МАНЕВИЧ**

ВНИИ молочной промышленности

Канд. техн. наук **Ю.К.ЮШИНА**

ВНИИМП им. В.М.Горбатова

Д-р мед. наук **Л.С.ФЕДОРОВА**

НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора

Канд. хим. наук **О.А.СИНИЦЫНА,**

д-р хим. наук **А.П.СИНИЦЫН**

МГУ им. М.В.Ломоносова

О.В.ЕМШАНОВ

ООО «БФР лабораториз»

Безопасность и качество продукции напрямую связаны с санитарно-гигиеническим состоянием технологического оборудования и производства в целом. Важнейшую роль играет регламентированная санитарная обработка, направленная на удаление органических, минеральных и микробиологических загрязнений с помощью моющих, чистящих и дезинфицирующих средств. Поскольку на любом пищевом предприятии созданы комфортные условия (благоприятная температура, влага, воздух, питательная среда) для развития различных микроорганизмов, необходимо контролировать их наличие, развитие и быть уверенным в достоверности полученных результатов.

Современные представления о микробиологической опасности отличаются от традиционных постулатов. Сегодня микробиологи признают, что большинство микроорганизмов существует в виде конгломерата в естественных и искусственно созданных окружающих средах — биопленках. Биологическая пленка — сообщество микроорганизмов, включающее клетки, которые прикреплены к поверхности и друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ. Их фенотип варьирует по сравнению с одиночными планктонными клетками, у них изменены параметры роста и экспрессии специфических генов.

Бактерии в прикрепленном состоянии, будучи интегрированными в биопленку, защищены от повреждающих факторов внешней среды, антибактериальных препаратов и дезинфицирующих средств. Более 95 % всех бактерий обитают на абиотических и биотических поверхностях в состоянии биопленки, а не в виде планктонных (свободноживущих) форм [1, 2].

Бактерии объединяются в сообщество благодаря гиперсинтезу экзоклеточного полисахаридного матрикса (ЭПМ), основным компонентом которого являются полисахариды. Клетки составляют порядка 15 % объема, матрикс — 85 %. Матрикс выполняет защитную и каркасную функции и слу-

жит средой для межклеточного взаимодействия. Экзополисахаридный матрикс у различных видов бактерий отличается по физическим свойствам и химическому составу, но, как правило, представляет собой анионный полимер, состоящий из гомо- и гетерополисахаридов (глюкуроновой кислоты, аминсахаров, сепациана, целлюлозы, альгината, декстранов, колановой кислоты и пр.), белков, ДНК, липидов и липополисахаридов, минералов [3].

В настоящее время детекция (обнаружение) и идентификация бактерий в состоянии биопленки затруднены, поскольку экзополисахаридный матрикс препятствует механическому переносу бактерий на питательные среды для последующей идентификации [4, 5]. Высока вероятность получения так называемых ложноотрицательных результатов микробиологических посевов.

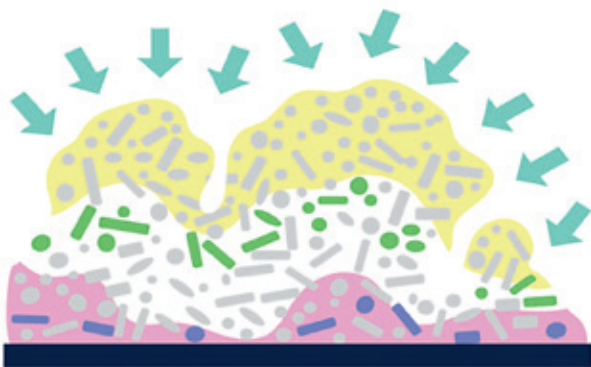
В практике микробиологического контроля перед проведением смывов (взятием проб) предлагается использовать специальные стерильные ферментные смеси для разрушения экзополисахаридного матрикса биопленки, увеличения доступности микроорганизмов за счет выхода их из-под защитного слоя матрикса и соответственно увеличения достоверности результатов смывов с исследуемых поверхностей.

На рис. 1 показана оценка высеваемости планктонных бактерий и бактерий в биопленке. Защитный (протективный) матрикс препятствует проникновению антимикробных препаратов внутрь биопленки (рис. 2) и определяет следующие механизмы устойчивости биопленки при воздействии антимикробных средств:

- замедляет проникновение биоцидов;
- некоторые микроорганизмы в биопленке снижают метаболическую активность в ответ на антимикробный стресс;
- матрикс в более глубокой области биопленки изменяется и уплотняется, чтобы противостоять уничтожению;



Рис. 1. Ложноотрицательные смывы: ЭПМ препятствует механическому переносу бактерий на диагностические питательные среды



- Сниженная пенетрация
- Стрессовый ответ
- Толерантность
- Особенности матрикса

Рис. 2. Механизмы устойчивости биопленки при воздействии антимикробных средств

• появляются бактериальные клетки-персистеры в высокой концентрации, которые фенотипически устойчивы к действию антибиотиков, поскольку активные молекулярные мишени последних у персистеров не выражены [6].

Применение дезинфицирующих средств с подтвержденной эффективностью лишь в отношении планктонных (отдельно растущих) микроорганизмов, а не биологических пленок может приводить к ускоренному формированию биопленок и сохранности микроорганизмов внутри матрикса.

Необходимо разработать и аттестовать методики культивирования биопленок с подтверждением их зрелости и изучением целевой эффективности дезинфицирующих средств в отношении микроорганизмов, находящихся в виде микробных сообществ (ассоциаций). Применение дезинфицирующих средств с доказанной эффективностью в отношении биологических пленок будет соответствовать реалиям сегодняшнего времени и повысит эффективность гигиенических процедур и дезинфекционных мероприятий.

Как анионный полимер, ЭПМ препятствует проникновению катионных антимикробных препаратов внутрь биопленки, например из группы катионных поверхностно-активных веществ — четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), третичных алкаламинов, полимерных и мономерных производных гаунидина, включая хлоргексидин.

Неэффективны в отношении зрелых биопленок также хлорактивные соединения, включая хлорамин и натриевую соль дихлоризоциануровой кислоты (ДХЦК), альдегиды и спирты в бактерицидных концентрациях. Средства на основе ЧАС оказались недостаточно эффективны против биопленок *E. coli*, *Pseudomonas*, *Listeria* и *S. aureus* даже в повышенных концентрациях: отрицательно заряженные полисахариды ЭПМ способны связывать положительно заряженные молекулы катионных ПАВ и тем самым защищать биопленку от уничтожения. Экзополисахариды в поверхностных слоях биологической пленки также инактивируют гипохлорит-ионы, снижая их активность [6, 7].

Известно, что для бактерий приобретение резистентности, т.е. способности микроорганизмов переносить значительно большие концентрации препарата, чем остальные микроорганизмы данного вида, или способность микроорганизмов размножаться в присутствии токсических соеди-

нений (бактериостатических или бактерицидных антибиотиков или дезинфицирующих средств), — не единственный способ выживания. Существует еще толерантность, подразумевающая «замирание» микроорганизма, при котором он не может расти и размножаться, но и не умирает. Если механизм резистентности — это нарушение взаимодействия между антибактериальным агентом и его мишенью, что позволяет микроорганизму размножаться в его присутствии, то толерантность — это отсутствие роста, но сохранение выживаемости в присутствии антибактериального агента. Толерантные микроорганизмы могут быть исходно чувствительны к антибактериальному агенту.

Толерантность — это фенотипическое свойство, оно не наследуется и легко может реверсировать в обычную чувствительность при наступлении благоприятных условий роста. Резистентность генетически наследуется в ряду поколений микроорганизмов или приобретает при горизонтальном переносе генов резистентности (плазмиды, транспозоны) [8].

Появляются толерантные клетки с измененными характеристиками, такие как клетки-персистеры и некультивируемые формы бактерий (*viable but nonculturable* — VBNC cell — некультивируемые формы клеток — НФ клеток). Индукторами образования персистеров и НФ могут быть голодание, непрямая температура, воздействие антибактериальных веществ, низкий уровень кислорода, окислительный стресс, pH, неоптимальный солевой состав. Однако персистеры довольно легко реверсируют в активно делящиеся клетки при прекращении воздействия антибактериальных веществ.

Для реверсии НФ требуются различные стимулы внешней среды, часто отличающиеся от факторов индукции и зависящие от вида бактерий. Факторы, стимулирующие VBNC-клетки и персистентность:

- случайные флуктуации экспрессии генов;
- факторы стресса окружающей среды, такие как недостаток питательных веществ, низкая/высокая температура, низкие/высокие изменения pH и окислительный стресс;
- микросреда в зрелых биопленках приводит к фенотипической гетерогенности, которая включает образование клеток VBNC и клеток-персистеров под воздействием различных факторов (снижение поступления кислорода, питательных веществ, высокая концентрация токсинов) [9].

К факторам, стимулирующим образование персистеров и НФ как в планктонных популяциях, так и в составе биопленки, относятся (рис. 3) экологический стресс, приводящий к изменению метаболических процессов в клетках



Рис. 3. Факторы, стимулирующие образование персистеров и некультивируемых форм

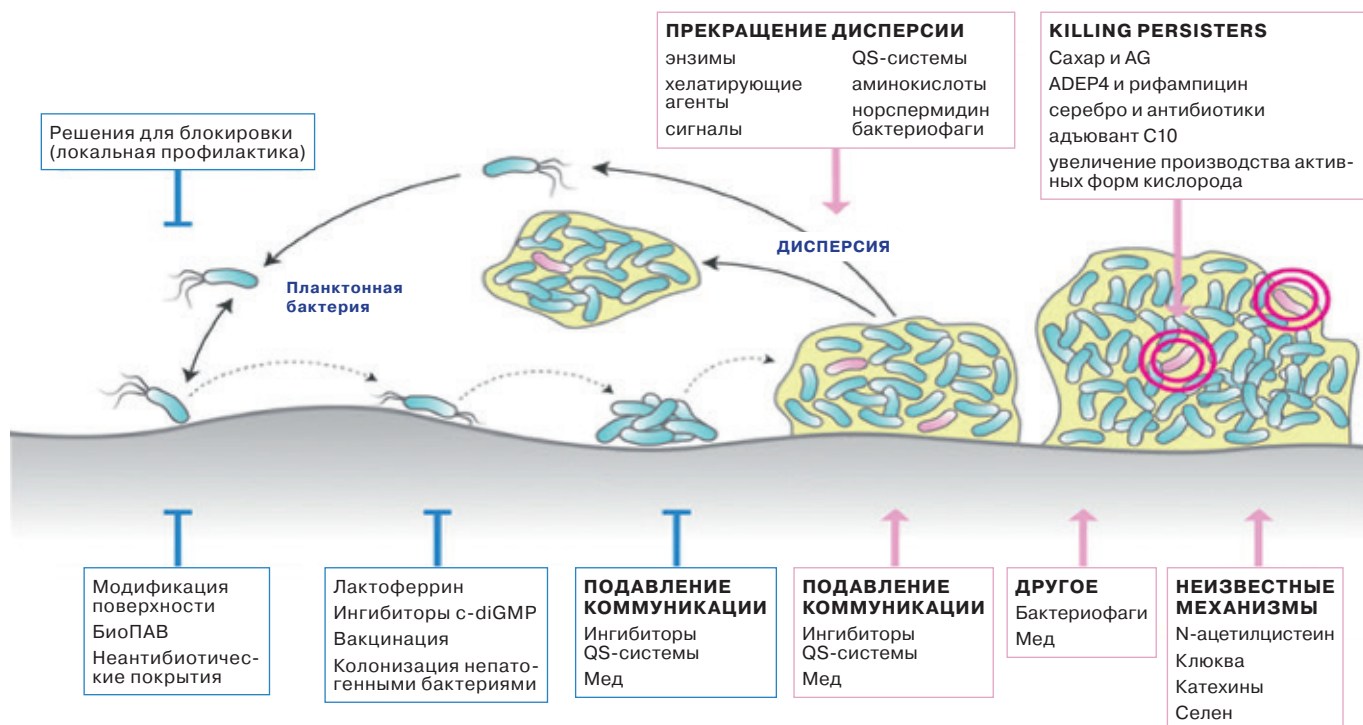


Рис. 4. Стратегии борьбы с биологическими пленками [11]

и на начальных этапах к образованию клеток-персистеров; длительный стресс, приводящий к увеличению содержания свободных токсинов и дальнейшему снижению метаболической активности, т.е. клетки остаются жизнеспособными, но некультивируемыми [10].

В соответствии с современными представлениями о биопленках и способах воздействия на их структуры можно выделить следующие основные направления борьбы с биопленками (рис. 4):

- поиск антиадгезивных материалов;
- разработка соединений, которые подавляют передачу сигналов QS-системы;
- использование физических средств борьбы (использование лазеров, холодной плазмы);
- создание препаратов, разрушающих матрикс биопленки и тем самым облегчающих доступ антибактериальных препаратов к клеткам;
- конструирование генно-инженерных фагов;
- комбинированное воздействие различными средствами (антибактериальные вещества и факторы, разрушающие матрикс) [11].

Одним из перспективных подходов в борьбе с биопленко-ассоциированной передачей микробного агента являются нарушение структурной целостности и дезорганизация микробной биопленки с последующим высвобождением бактерий, доступных для антибактериального воздействия (биоцидные препараты, антибиотики). С этой целью применяют ферменты, способные разрушать полисахариды защитного матрикса. Высвобождаемые из протективного барьера бактерии могут быть в последующем уничтожены.

Продемонстрированы возможности группы ферментов карбогидраз (подкласс гликозидаз КФ 3.2.1, гидролаз и лиаз), расщепляющих O-гликозидные связи, разрушать полисахариды ЭПМ биопленки. При этом различные гид-

ралазы и лиазы имели разную активность в отношении разных полисахаридов [12]. Предлагаемая нами система борьбы с биопленками — комплекс последовательных мероприятий по обнаружению (детекции) и уничтожению (деструкции) биологических пленок на различных поверхностях, подразумевающий проведение двухступенчатой процедуры. Первая ступень — обнаружение (детекция) биологических пленок при помощи каталазного теста и проведения высокодостоверных микробиологических смывов с поверхностей при помощи энзимных препаратов. Вторая ступень — уничтожение (деструкция) микроорганизмов в состоянии биологических пленок препаратами на основе высокоэффективных мультиферментных смесей.

Первая ступень системы состоит из двух этапов. На первом этапе первой ступени системы осуществляется каталазный тест. Каталаза является основным первичным антиоксидантом системы защиты, который катализирует разложение перекиси водорода до воды. Перекись водорода разрушается двумя классами родственных ферментов, катализирующих ее двухэлектронное восстановление до H_2O и использующих в качестве донора электронов H_2O_2 в случае каталазы или различных органические соединения в случае пероксидазы. Положительная реакция — это образование мелкой специфической пены (барботирование — реакция бактериального фермента каталазы с пероксидом водорода). Пена, которая образуется после нанесения индикатора в течение 5–30 с, показывает, где именно остаются после обработки (мытья и дезинфекции) опасные уровни клинически значимых микроорганизмов. Чувствительность индикатора находится в пределах от 10^4 до 10^6 кл/мл.

Второй этап первой ступени системы представляет собой экспресс-тест, позволяющий разрушить экзополисахаридный матрикс (ЭПМ) биопленки и открыть за-

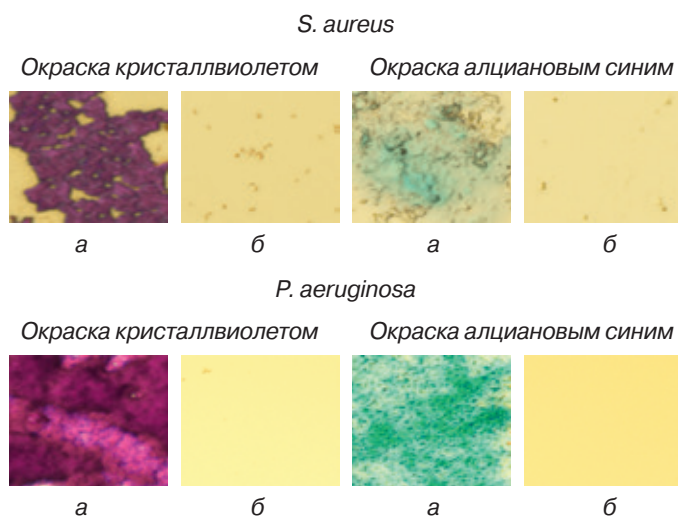


Рис. 5. Визуализация биопленок, образованных *S. aureus* и *P. aeruginosa*: а – нативных; б – после обработки ферментными смесями на основе КРПБ (работы выполнены в НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалея)

щитаемые им бактерии для воздействия или различных манипуляций. Индикатор, используемый для проведения данного теста, состоит из смеси ферментов класса карбогидраз, которые разрушают специфические полисахариды экзополисахаридного матрикса биопленки (карбогидразы, разрушающие полисахариды биопленки, — КРПБ). Индикатор обладает высокой активностью в отношении полисахаридов, белков, липидов и других структурных составляющих экзополисахаридного матрикса (ЭПМ) биологических пленок грамположительных и грамотрицательных бактерий. Индикатор разрушает составляющие ЭПМ биопленок, в результате чего планктонные бактерии лишаются протективного (защитного) барьера и становятся доступными для различных манипуляций. Индикатор имеет время экспозиции, в течение которого он эффективно воздействует на структуры экзополисахаридного матрикса биопленки от 5 до 60 мин в зависимости от степени зрелости биопленки. Эффективность раствора ферментной смеси на основе КРПБ на биопленки микроорганизмов различных видов в течение разного времени контакта продемонстрирована на рис. 5–7.

Индикатор должен быть стерильным. Наносится на исследуемые поверхности, и через 5–10 мин (время, в течение которого разрушается ЭПМ биопленки) без смывания берутся смывы на диагностические питательные среды.

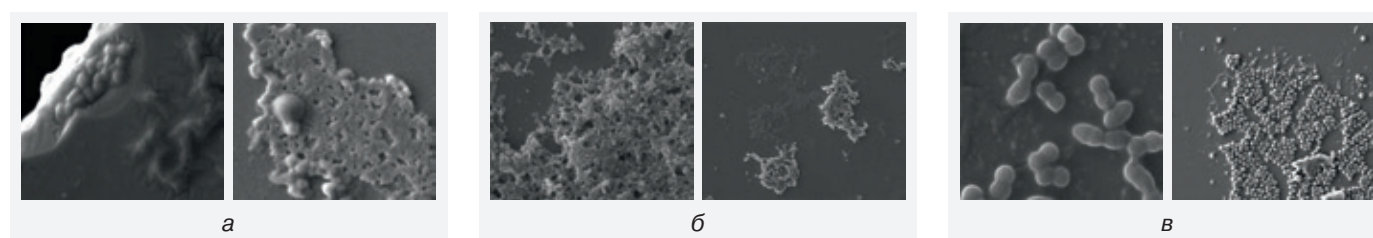


Рис. 6. Визуализация биопленок. Электронная микрофотография (работы выполнены в НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалея): а – зрелые нативные биопленки *S. aureus* до обработки раствором ферментной смеси на основе КРПБ; б – разрушение экзополисахаридного матрикса биопленки после воздействия раствора ферментной смеси на основе КРПБ; в – визуализация бактериальных клеток, свободных от экзополисахаридного матрикса после воздействия раствора ферментной смеси на основе КРПБ в течение 10 мин

Активность мультиферментных смесей (на основе КРПБ) испытана в ходе НИОКР в рамках Договора № 3099ГС1/48651 о предоставлении гранта на проведение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ от 19 июля 2019 г. с ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям). Результаты зафиксированы в Научном отчете № Госрегистрации АААА-А19-119072390056-1 (УДК 615.4:613/614) «Разработка опытных образцов индикаторов биологических пленок (на основе перекисных соединений, на основе флуорохромного красителя и на основе ферментной смеси) и исследование их целевой эффективности для детекции (обнаружения) биологических пленок бактерий» [12].

Вторая ступень системы — деструкция (уничтожение) микроорганизмов в состоянии биологических пленок препаратами на основе высокоэффективных мультиферментных смесей, содержащих КРПБ, и активно действующих веществ (АДВ) дезинфицирующих средств. Понятие деструкции (уничтожения) биологических пленок подразумевает полное разрушение защитного экзополисахаридного матрикса и умерщвление микроорганизмов внутри биопленки.

Мультиферментные смеси на основе КРПБ могут быть в составе с различными АДВ, например NN-бис(3-аминопропил)додециламином, четвертичными аммониевыми соединениями, полимерными и мономерными соединениями гуанидина, включая хлоргексидин биглюконат, пероксидом водорода, перкарбонатом натрия и ТАЕД, спиртом этиловым, пропиловым или изопропиловым, коллоидным серебром, гипохлоритом натрия или натриевой солью дихлоризоциануровой кислоты.

Основной параметр, который нужно соблюдать при использовании таких смесей, — это достаточная активность ферментов, применяемых для разрушения ЭПМ биопленок. Ферменты желателно добавлять в растворы непосредственно перед использованием.

Основную роль в образовании биопленок на абиотических поверхностях играет наличие жидкости и питательных веществ. Наиболее критичными в плане формирования биологических пленок являются оборудование, аппаратура, изделия и инвентарь из стали, пластика, силикона, резины, дерева без контроля износа, а также открытые пористые поверхности — бетон, пористый пластик, застойные и труднодоступные места (резьбовые соединения и стыки). К критическим точкам пищевых производств относятся офисные и санитарно-технические помещения, столовая, уборка-клининг, фасовка и транспортировка, разделка и нарезка, оборудование.

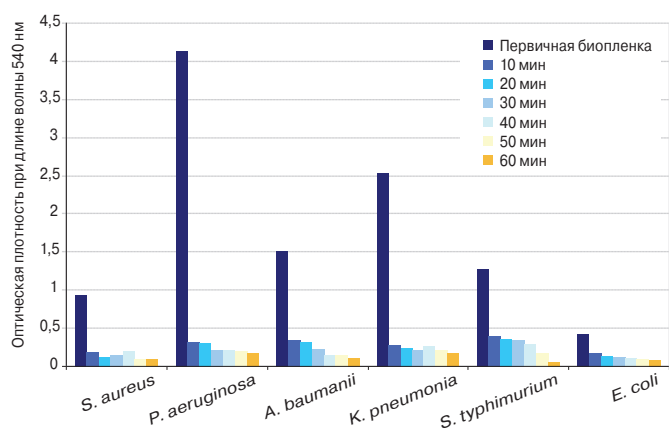


Рис. 7. Разрушение экзополисахаридного матрикса биопленок различных бактерий под воздействием ферментной смеси на основе КРПБ

Рекомендованные места отбора проб на пищевых предприятиях:

- застойные, труднодоступные для моющих и дезинфицирующих средств зоны (стыковые соединения, сварные швы, узкие каналы, мембранные фильтры, решетки сепараторов, сита и т.д.);
- резьбовые соединения сосудов и резервуаров;
- полы и стены;
- пористые поверхности оборудования и инвентаря (пластиковая тара, корродированный металл);
- объемные резервуары (малые фиксированные и движущиеся внутренние элементы);
- конвейеры (мелкие элементы (болты, уплотнители), трещины на полотне);
- пробоотборники, краны, клапаны, дренажные каналы;
- шланги, уплотнители, перчатки, резиновые и силиконовые насадки;
- поверхности и края инвентаря, подверженные механическим нагрузкам (лезвие ножей, край пластиковых и металлических совков, разделочные доски, пластиковая и металлическая тара).

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрированы МР 4.2.0161–19 «Методы индикации биологи-

ческих пленок микроорганизмов на абиотических объектах», в которых описаны этапы индикации:

- визуальная индикация мест локализации биопленок с помощью каталазного экспресс-теста;
- визуальная индикация мест локализации биопленок с помощью флуорохромных красителей и дальнейшей визуализации их при помощи специального освещения;
- разрушение экзополисахаридного матрикса биопленки специальными ферментными индикаторами с последующим отбором и микробиологическим исследованием проб смывов.

Этапность и очередность тестов не являются обязательными. Тесты применяются в зависимости от конкретных поставленных задач.

Таким образом, поверхности необходимо обрабатывать с учетом вышесказанного, в том числе применять ротацию действующих веществ дезинфицирующих средств, принимая во внимание различные механизмы действия их на планктонную клетку. Например, при использовании хлорактивных соединений, учитывая их небольшую способность проникать через защитный матрикс биопленки, необходимо применять комбинацию с ферментными смесями (на основе КРПБ), позволяющими беспрепятственно достигать мишени воздействия. Препараты на основе кислородоактивных соединений имеют более высокую эффективность в отношении биопленки по сравнению с другими АДВ, но имеют дозозависимый эффект, и при использовании в бактерицидных концентрациях рекомендовано применять их в смеси с ферментами из группы карбогидраз, эффективных в отношении полисахаридов матрикса (на основе КРПБ) [12]. Рекомендованные схемы обработки с учетом ротации дезинфицирующих средств продемонстрированы в таблице.

В заключение необходимо отметить, что получение новых знаний о существовании и развитии микроорганизмов должно определять новые подходы к проведению санитарно-гигиенических мероприятий на пищевых предприятиях, эффективных способов идентификации и уничтожения биопленок. Встречающиеся расхождения в эффективности определенных дезинфицирующих средств *in vitro* при тестировании на планктонных формах микроорганизмов при проведении лабораторных иссле-

Тип обработки	Тип препаратов			
	Каталазный тест	Окраска флуорохромным красителем	Окраска УФ-меткой	Люминометрия
Детекция				
Гигиенический контроль	Каталазный тест	Окраска флуорохромным красителем	Окраска УФ-меткой	Люминометрия
Микробиологический контроль	Высокодостоверные смывы после обработки ферментами		Стандартные микробиологические смывы	
Очистка	Щелочное средство		Кислотное средство	Энзимное средство
Очистка и антиадгезивная обработка	Энзимное средство (на основе КРПБ) + ПАВ			
Дезинфекция и очистка/ текущие уборки	Гипохлорит натрия + смеси на основе КРПБ		ДХЦК + смеси на основе КРПБ	Ротация 1 раз в полгода или квартал
Дезинфекция и очистка/ текущие уборки	Третичные алкиламины + смеси на основе КРПБ			
Дезинфекция и очистка/ текущие уборки	НУК + пероксид водорода + смеси на основе КРПБ		Пероксид водорода + коллоидное серебро + смеси на основе КРПБ	
Дезинфекция и очистка/ генеральные уборки	НУК + пероксид водорода + смеси на основе КРПБ		Пероксид водорода + коллоидное серебро + смеси на основе КРПБ	Ротация 1 раз в полгода или квартал
Дезинфекция и очистка/ генеральные уборки	Третичные алкиламины + смеси на основе КРПБ			

дований и практических испытаний *in vivo* в процессе дезинфекционных мероприятий в реальных производственных условиях обуславливают разработку новых методик определения эффективности дезинфицирующих средств в отношении биологических пленок бактерий.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Смирнова, Т.А.** Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок/ Т.А.Смирнова [и др.]// Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 435–446.
2. **O'Toole, G.A.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development/ G.A.O'Toole, R.Kolter// *Mol. Microbiol.* 1998. V. 30. P. 295–304.
3. **Takenaka, Sh.** Adverse Influences of Antimicrobial Strategy against Mature Oral Biofilm. Additional information is available at the end of the chapter/ Sh. Takenaka [et al.]// In book: *Microbial Biofilms – Importance and Applications*, 2016. <http://dx.doi.org/10.5772/63564>.
4. **Романова, Ю.М.** Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium*/ Ю.М.Романова и [др.]// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 4. С. 38–42.
5. **Диденко, Л.В.** Влияние третичных алкиламинов на биопленки, образованные *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* (бактериологическое и электронно-микроскопическое исследование)/ Л.В. Диденко [и др.]// Дезинфекционное дело. 2014. № 2. С. 40–45.
6. **Brown, M.R.W.** Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents/ M.R.W.Brown, P.Gilbert// *Journal of Applied Bacteriology*. 1993. V. 74. I. S22. P. 875–975.
7. **Gómez de Saravia, S.G.** Non-invasive methods for monitoring biofilm growth in industrial water systems/ S.G.Gómez de Saravia, M.F.Lorenzo de Mele// *Latin American applied research Pesquisa aplicada latino americana*. 2003. V. 33(3). P. 353–359.
8. **Branda, S.S.** Biofilms: the matrix revisited/ S.S.Branda, A.Vik// *Trends in microbiol.* 2005. V. 13. № 1. P. 21–25.
9. **Ayrapetyan, M.** Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria/ M.Ayrapetyan, T.C.Williams, J.D.Oliver// *Trends in Microbiology*. TIMI-1129. P. 7.
10. **Ayrapetyan, M.** Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum/ M.Ayrapetyan [et al.]// *Infection and Immunity*. 2015. V. 83. № 11. P. 4194–4203.
11. **Lebeaux, D.** Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics/ D.Lebeaux, J.-M.Ghigo, C.Beloina// *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2014. V. 78. № 3. P. 510–543.
12. **Романова, Ю.М.** Ферменты из группы карбогидраз разрушают структуру матрикса биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий/ Ю.М.Романова [и др.]// Медицинский алфавит. 2019. № 34 (409). Т. 4 «Стоματοлогия». С. 40–45.