



Оценка бактерицидной активности дезинфекционных средств в отношении возбудителя холеры для деконтаминации судовых балластных вод

Чемисова О.С.,
Сагакянц М.М.,
Голенищева Е.Н.,
Санамянц Е.М.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт»
Роспотребнадзора

Для предотвращения заноса возбудителя холеры с балластными водами судов актуальна разработка способов их деконтаминации. Представлены результаты исследований бактерицидной активности дезинфицирующих препаратов на основе четвертичных аммониевых соединений, производных гуанидина, перекиси водорода и соединений хлора в отношении возбудителя холеры. Определение эффективной рабочей концентрации и режимов обеззараживания проводили суспензионным методом и на модели биопленки с учетом условий, создаваемых в балластных танках судов.

Ключевые слова:

Vibrio cholerae, дезинфицирующий препарат, концентрация, экспозиция, бактерицидные свойства
Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018. Т. 7, № 3. С. 15–19.
doi: 10.24411/2305-3496-2018-13002

Статья поступила в редакцию: 05.02.2018. Принята в печать: 13.07.2018.

Evaluation of the disinfectants bactericidal activity against the causative agent of cholera for the decontamination of ship's ballast water

Chemisova O.S., Sagakyants M.M., Rostov-on-Don Anti-Plague Institute
Golenishcheva E.N.,
Sanamyants E.M.

To prevent the introduction of cholera pathogen from ballast water of ships, the development of methods of their decontamination is relevant. The results of studies of the bactericidal activity of disinfectants based on quaternary ammonium compounds, guanidine derivatives, hydrogen peroxide and chlorine compounds against the cholera pathogen are presented. Determination of the effective working concentration and decontamination regimes was carried out by suspension method and biofilm model, taking into account the conditions created in the ballast tanks of ships.

Keywords:

Vibrio cholerae, disinfectant, concentration, exposure, bactericidal properties

Infectious Diseases: News, Opinions, Training. 2018; 7 (3): 15–9.

doi: 10.24411/2305-3496-2018-13002

Received: 05.02.2018. Accepted: 13.07.2018.

Холера остается приоритетной проблемой мирового здравоохранения в связи с существованием факторов, способствующих ее глобальному распространению: пандемическое, поступательное распространение инфекции по континентам и странам за счет «импорта инфекции»; чрезвычайные ситуации природного и социального характера; стойкие эндемичные очаги холеры в Азии, Африке и странах Карибского бассейна; природные и социальные условия [1]. Одним из путей заноса холерного вибриона может стать его перенос в судовых балластных водах и их осадках. Например, в 1991 и 1992 гг. токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 *El Tor* были выделены из балластной воды грузовых судов, прибывших в порты Мексиканского залива США [2]. В ответ на решение экологических и экономических проблем глобального характера Международная морская организация (ИМО) в 2004 г. разработала Международную конвенцию по контролю и управлению судовыми балластными водами и осадками (International Convention for the Control and Management of Ships Ballast Water and Sediments, далее – Конвенция), которая в 2007 г. была одобрена Российской Федерацией. Данный документ предписывает, что с 2009 по 2019 г. все суда, имеющие балластные танки и совершающие международные рейсы, должны быть снабжены специальными системами для обработки судовых балластных вод, обеспечивающими требуемую минимальную концентрацию жизнеспособных организмов с обязательным удалением осадков [3, 4]. Согласно рекомендациям Конвенции, одним из индикаторных микроорганизмов, которые должны отсутствовать в балластных водах, являются токсигенные холерные вибрионы.

Способом деконтаминации балластных вод на борту судна, предлагаемым Конвенцией, является химический, основанный на использовании дезинфицирующих средств (ДС). В настоящее время на рынке химических средств обеззараживания представлены около 650 наименований antimicrobных препаратов, зарегистрированных только

в России [5]. Выбор дезинфицирующих веществ для деконтаминации балластных вод имеет много ограничений: возможное негативное воздействие на экипаж, коррозия труб, насосов, покрытий балластных танков, загрязнение морской воды в результате сброса балласта [6]. Следует отметить, что в результате многолетнего использования традиционных ДС участилось появление штаммов микроорганизмов, грибов и вирусов, резистентных к их воздействию [7]. В связи с этим актуален поиск соединений, характеризующихся малой токсичностью для людей, инертностью для технологического оборудования, но вместе с тем обладающих высокой активностью против микроорганизмов.

Цель настоящего исследования – подбор химических препаратов для обработки судового водного балласта на основе изучения их бактерицидной активности в отношении возбудителя холеры.

Материал и методы

Для исследования были отобраны 30 штаммов *V. cholerae* из музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Из них *V. cholerae* O1 *El Tor* – 22 штамма: 5 штаммов токсигенных (*ctx+*) и 17 нетоксигенных (*ctx-*); *V. cholerae* O139 – 6 штаммов (2 из них токсигенные, 4 нетоксигенные); *V. cholerae non O1/non O139* – 2 штамма (*ctx-*).

В работе были использованы ДС на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), соединений хлора, производных гуанидина, перекиси водорода (табл. 1). Бактерицидные свойства ДС исследовали количественным суспензионным методом в соответствии с Р 4.2.2643-10 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности» [8]. Для исключения бактериостатического действия препаратов на основе ЧАС и производных гуанидина применяли универсальный нейтрализатор, состоящий из 3% твина-80, 3% са-

Таблица 1. Характеристика препаратов дезинфицирующих средств (ДС) по документации производителей

Препарат	Внешний вид	Массовая доля активного вещества, входящего в состав ДС, %	Действующее вещество, входящее в состав ДС, %
Препарат 1	Прозрачная жидкость лимонно-желтого цвета	25	Алкилдиметилбензиламмоний хлорид
Препарат 2	Прозрачная жидкость голубого цвета	3,8±0,15	Октилдецилдиметиламмоний хлорид (30%), тетрадецилдиметилбензиламмоний хлорид (20%), додецилметилбензиламмоний хлорид (16%), диоктилдиметиламмоний хлорид (15%), дидецилдиметиламмоний хлорид (15%), гексадецилдиметилбензиламмоний хлорид (4%)
Препарат 3	Прозрачное стеклообразное вещество в виде мелких частиц, от бесцветного до желтого цвета	≥95	Полигексаметиленгуанидина гидрохлорид
Препарат 4	Прозрачная бесцветная жидкость	30–40	Перекись водорода
Препарат 5	Кристаллический порошок белого цвета с резким запахом	≥98,0	Хлорамин

пониная, 0,1% гистидина, 0,1% цистеина солянокислого; препаратов на основе соединений хлора и перекиси водорода – 0,1% тиосульфата натрия. Рабочие разведения ДС готовили на стерильной питьевой и морской воде непосредственно перед проведением исследования. Из суточных культур холерных вибрионов, выращенных на 2% агаре Мартена (рН 7,7) при температуре 37 °С, готовили взвесь на стерильной питьевой и морской воде с концентрацией 1×10^9 мк/мл по стандарту мутности для оптической стандартизации бактерий (5 МЕ). Растворы ДС разливали по 4,5 мл в стерильные пробирки. В каждую пробирку с ДС добавляли по 0,5 мл взвеси микроорганизмов. Каждое разведение тщательно перемешивали. Экспозиция составляла 5, 30, 60 мин, после которой по 0,5 мл смеси «микроорганизм + ДС» добавляли к 4,5 мл нейтрализатора соответствующей группы, перемешивали встряхиванием и оставляли на 5 мин. Затем вносили по 0,5 мл в пробирки с 4,5 мл стерильной питьевой воды, после чего 0,1 мл из этой пробы вносили в пробирки с 5 мл бульона Мартена (рН 7,7) и на поверхность агара Мартена (рН 7,7). Параллельно ставили контроли: взвеси тестируемых штаммов вносили вместо ДС в стерильную питьевую и морскую воду. Далее посеы помещали в термостат для инкубации при температуре выращивания 37 °С на 24–48 ч. Об эффективности дезинфектантов судили по наличию/отсутствию роста колоний тестируемых штаммов холерных вибрионов на поверхности плотных питательных сред. Все исследования проводили в 3 повторениях.

На втором этапе работы бактерицидное действие ДС в отношении биопленок холерных вибрионов изучали на модели, предложенной С.В. Титовой и соавт. [9]. Для получения биопленок покровные стекла помещали во флаконы со стерильной питьевой и морской водой, вносили взвесь холерных вибрионов до получения конечной концентрации 10^4 микробных кл/мл. Культивировали при температуре 25 °С в течение 5 сут. Далее покровные стекла промывали для удаления планктона и вносили в пробирки с ДС в различных концентрациях. Время экспозиции в ДС составляла 5, 30, 60 мин при температуре 25 °С. Далее вносили в нейтрализатор и через 5 мин осуществляли высевы на питательные среды. В качестве контроля во флаконы вместо ДС вносили стерильную водопроводную воду. Жизнеспособность клеток холерных вибрионов учитывали путем посева на пластинки 2% агара Мартена (рН 7,6) отпечатком покровного стекла, погружая стекла в бульон Мартена (рН 7,6). Посевы инкубировали при температуре 37 °С на 24 ч. Для исключения биоцидного действия ДС из пробирок, в которых отсутствовал рост холерных вибрионов, каждые 24 ч осуществляли пересев по 0,5 мл в 4,5 мл бульона Мартена (рН 7,6) в течение 5–7 сут.

Работу со штаммами холерных вибрионов проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» [10].

Результаты и обсуждение

Согласно Конвенции, к группе индикаторных микробов балластной воды в соответствии со стандартом качества балластных вод относят токсигенный холерный вибрион 01 и 0139 серогрупп в количестве <1 колониеобразующей еди-

ницы (КОЕ) на 100 мл или <1 КОЕ на 1 г сырой массы образцов зоопланктона [3]. Традиционно в качестве дезинфицирующих средств при обеззараживании объектов, загрязненных холерными вибрионами, относящимися ко II классу патогенности (опасности), используют хлорсодержащие соединения и перекись водорода. Привлекательность хлорсодержащих средств объясняется высокой антимикробной активностью, широким спектром действия и относительно низкой стоимостью. Однако возможность образования токсичных хлорпроизводных в процессе обработки не может не учитываться, особенно принимая во внимание большой объем балластных вод (тысячи тонн воды на одно судно). Применение перекиси водорода как дезинфицирующего средства основано на ее способности разлагаться на воду и активный кислород, способный к окислительным реакциям. Благодаря этому перекись водорода обладает особым достоинством: не загрязняет окружающую среду, но это же свойство сильного окислителя ограничивает ее применение на судах из-за высокого риска коррозии металлов. В последнее время во всех странах мира широко применяются ЧАС и производные гуанидина как ДС и антисептики, что объясняется их невысокой токсичностью для людей, высокой стабильностью при хранении, антикоррозионным, антистатическим и щадящим действием на обрабатываемые объекты [11].

В проведенной работе исследована бактерицидная активность препаратов, относящихся ко всем вышеперечисленным группам ДС: препараты на основе ЧАС, производных гуанидина, соединений хлора и перекиси водорода. Для приготовления рабочих разведений использовали стерильную питьевую воду, согласно общепринятой методике, а также морскую воду (из Таганрогского залива), что приближает проведение опыта к условиям практического применения.

Результаты определения бактерицидных свойств дезинфектантов относительно штаммов холерных вибрионов суспензионным методом представлены в табл. 2. Было установлено, что препараты на основе ЧАС обеспечивают обеззараживание воды в течение 30 мин в концентрации 0,1% по действующему веществу. Известно, что бактерицидная активность ДС на основе ЧАС повышается, если в состав данных дезинфектантов входят сразу несколько веществ. Проведенные исследования показали, что подобный эффект наблюдали и в отношении холерных вибрионов: комбинированный препарат № 2, включающий 6 анионных компонентов, проявлял бактерицидную активность в концентрации 0,01% в течение 30 мин. ДС на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида было эффективно в концентрации 0,01% при короткой экспозиции 5 мин. В отношении хлорамина Б и перекиси водорода штаммы были чувствительны к 0,1–1% в зависимости от экспозиции. При этом ни в одном эксперименте не выявлено разницы в чувствительности штаммов при использовании в эксперименте стерильной питьевой и морской воды.

Вместе с тем общеизвестно, что микроорганизмы характеризуются наличием механизмов противодействия негативным факторам окружающей среды. Одним из таких способов является формирование биопленок. Способность продуцировать экзополисахарид (окружает клетку защитным чехлом и способствует образованию сложной структуры с каналами, через которые поступают питательные вещества к бактериям и вымываются продукты их жизнедеятельности)

Таблица 2. Бактерицидное действие дезинфицирующих средств на штаммы *V. cholerae* (суспензионный метод)

Экспозиция действия, мин	Дезинфицирующий препарат, концентрация ДВ, %														
	препарат 1			препарат 2			препарат 3			препарат 4			препарат 5		
	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	1	0,1	0,01	1	0,1	0,01
5	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
30	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
60	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

Примечание. Здесь и в табл. 3: ДВ – действующее вещество; «+» – рост штаммов *V. cholerae* на поверхности питательной среды; «-» – отсутствие роста штаммов *V. cholerae* на поверхности питательной среды.

Таблица 3. Бактерицидное действие дезинфицирующих средств (ДВ) на штаммы *V. cholerae* (биоленки)

Экспозиция действия, мин	Дезинфицирующий препарат, концентрация ДВ, %														
	препарат 1			препарат 2			препарат 3			препарат 4			препарат 5		
	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	1	0,1	0,01	1	0,1	0,01
5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
30	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
60	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

и формировать биоленку имеет важное значение для выживания *V. cholerae El Tor* в водной среде [12, 13]. С.В. Титова и соавт. [14] показали увеличение устойчивости холерных вибрионов в составе биоленок к действию перекиси водорода и хлорамина Б по сравнению с планктонными формами. Для балластных танков судов характерно биологическое обрастание поверхностей, что может повлиять на эффективность обработки ДС. В связи с этим следующим этапом работы было изучение бактерицидной эффективности исследуемых препаратов на модели биоленки.

Полученные результаты показали, что холерные вибрионы в составе биоленки, в отличие от планктонных форм, оказались устойчивее к изученным ДС (табл. 3). Устойчивость к 0,1% концентрации ДС на основе ЧАС при краткосрочной экспозиции (5 мин) была выявлена у 10% штаммов холерных вибрионов, взятых в исследование. Увеличение действующих концентраций ДС для эффективного воздействия на биоленки холерных вибрионов было необходимо для полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и хлорамина Б. Применение перекиси водорода в отношении биоленок было эффективно в тех же концентрациях (0,1% в течение 60 мин и 1% в течение 5–30 мин), однако число штаммов, устойчивых к 0,1% разведению перекиси водорода, увеличилось в 2 раза. Полученные данные свидетельствуют, что все исследованные ДС обладают выраженной бактерицидной активностью в отношении холерных вибрионов в условиях, приближенных к тем, которые могут быть в балластных танках (соленость воды, наличие биоленок). Однако при определении эффективной рабочей концентрации и режимов обеззараживания, помимо суспензионного метода, необходимо использовать модель биоленкообразования.

Таким образом, установлены эффективные бактерицидные концентрации ДС различных групп в отношении возбудителя холеры, которые можно применять в том числе для деконтаминации балластных вод судов: алкилдиметилбензиламмоний хлорид и полигексаметиленгуанидин гидрохлорид – в концентрации 0,1 и 0,01% соответственно, не менее 30 мин, перекись водорода и хлорамин – 1% не менее 30 мин.

Анализ данных научной литературы позволяет сделать вывод, что среди широкого ассортимента ДС нет препаратов, полностью отвечающих всем требованиям: высокая антимикробная активность, мгновенное действие, отсутствие коррозионных и токсичных свойств, безопасность для обслуживающего персонала и животных, экологическая безопасность, экономичность и пр. Объем балластных танков судов может достигать несколько десятков тысяч тонн. Применение исследованных препаратов даже в минимально действующих концентрациях (0,01%) потребует использования для обеззараживания воды, например, одного судна с объемом балласта 10 тыс. м³ тысячи килограмм действующего вещества, что даже при таком приблизительном расчете демонстрирует ограниченность применения химического способа обеззараживания. Именно этим объясняется интенсивная разработка установок на основе физических методов обеззараживания для повседневного использования в соответствии с рекомендациями Конвенции. Однако в случае чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера, при выделении токсигенного штамма холерного вибриона из пробы балластной воды и создании угрозы распространения этой особо опасной инфекции средства экстренной профилактики в виде химических ДС необходимы, к тому же в настоящее время они самые доступные.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора:

Чемисова Ольга Сергеевна – кандидат биологических наук, временно исполняющая обязанности заместителя директора по научной работе

E-mail: chemisova@inbox.ru

Сагакянц Маргарита Мардиросовна – младший научный сотрудник

E-mail: margasagak@rambler.ru

Голенищева Елена Николаевна – научный сотрудник

E-mail: Golenisheva111@g.mail.com

Санамянц Елена Михайловна – научный сотрудник

E-mail: plague@aanet.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Титова С.В., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Писанов Р.В. и др. Эпидемиология холеры и прогноз по регионам, современные подходы к мониторингу холеры // Холера и патогенные для человека вибрионы : материалы проблемной комиссии. Ростов н/Д, 2015. Т. 28. С. 10–16.
2. McCarthy S.A., Khambaty F.M. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. Vol. 60, N 7. P. 2597–2601.
3. Международная конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года. СПб. : ЗАО ЦНИИМФ, 2005.
4. Водяницкая С.Ю., Судьина Л.В., Баташев В.В., Павлович Н.В. Применение различных способов деконтаминации водяного балласта // Холера и патогенные для человека вибрионы : материалы проблемной комиссии. Ростов н/Д, 2016. Т. 29. С. 89–92.
5. Прилуцкий В.И., Шомовская Н.Ю., Долгополов В.И. Выбор дезинфицирующих средств: многообразие выбора – многообразие проблем // *Мед. алфавит. Эпидемиология и санитария.* 2010. № 1. С. 39–44.
6. Судьина Л.В., Водяницкая С.Ю. К вопросу о деконтаминации судовых балластных вод (обзор литературы) // *Дезинфек. дело.* 2016. № 3. С. 46–53.
7. Шкарин В.В. Дезинфекция. Дезинсекция и дератизация: руководство для студентов медицинских вузов и врачей. Н. Новгород : Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2006.
8. Руководство Р 4.2.2643-10. «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности». М. : Роспотребнадзор, 2011.
9. Титова С.В., Веркина Л.М., Лысова Л.К. Потенциальная возможность инфицирования водных объектов биопленками холерного вибриона // *Изв. вузов. Северо-Кавказский регион.* 2016. № 1. С. 80–83.
10. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». М. : Роспотребнадзор, 2014.
11. Федорова Л.С. Теория и практика совершенствования дезинфицирующих средств. М. : Медицина, 2006.
12. Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках // *Микробиология.* 2010. Т. 79, № 4. С. 447–458.
13. Детушева Е.В. Моделирование биопленки у бактерий на плотной питательной среде и изучение закономерностей формирования устойчивости к триклозану : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Оболensk, 2016.
14. Титова С.В., Веркина Л.М., Кирилова О.Д., Лысова Л.К. и др. Действие перекиси водорода и хлорамина Б на биопленки холерных вибрионов // *Дезинфек. дело.* 2015. № 3. С. 6–13.

REFERENCES

1. Titova S.V., Moskvitina E.A., Monakhova E.V., Pisanov R.V., et al. Epidemiology of cholera and prognosis by regions, modern approaches to cholera monitoring. In: *Cholera and human pathogenic vibrios: materials of the problematic commission.* Rostov-on-Don. 2015; 28: 10–6. (in Russian)
2. McCarthy S.A., Khambaty F.M. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60 (7): 2597–601.
3. International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments, 2004. Saint Petersburg: Central Marine Research and Design Institute; 2005. (in Russian)
4. Vodyanitskaya S.Yu., Sud'ina L.V., Batashev V.V., Pavlovich N.V. Application of various ways of decontamination of water ballast. In: *Cholera and human pathogenic vibrios: materials of the problematic commission.* Rostov-on-Don. 2016; 29: 89–92. (in Russian)
5. Prilutskiy V.I., Shomovskaya N.Yu., Dolgoplov V.I. Choice of disinfectants: variety of choice - variety of problems. *Meditsinskiy alfavit. Epidemiologiya i sanitariya [Medical Alphabet. Epidemiology and Hygiene].* 2010; 1: 39–44. (in Russian)
6. Sud'ina L.V., Vodyanitskaya S.Yu. To the question of decontamination of ships' ballast water (Literature review). *Dezinfektsionnoe delo [Disinfection Affairs].* 2016; (3): 46–53. (in Russian)
7. Shkarin V.V. Disinfection. Disinsection and deratization: guide for students of medical universities and doctors. Nizhny Novgorod: Publishing house of Nizhny Novgorod State Medical Academy; 2006. (in Russian)
8. Guidance R 4.2.2643-10. "Methods of laboratory research and testing of disinfectants to assess their effectiveness and safety". Moscow: Rospotrebnadzor; 2011. (in Russian)
9. Titova S.V., Verkina L.M., Lysova L.K. The possibility of water objects infection by vibrio cholerae biofilms. *Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskiy region [University News North-Caucasian Region. Natural sciences series].* 2016; (1): 80–3. (in Russian)
10. Sanitary-epidemiological rules of SP 1.3.3118-13 "Safety of work with microorganisms of I–II pathogenicity groups (dangers)". Moscow: Rospotrebnadzor; 2014. (in Russian)
11. Fedorova L.S. Theory and practice of improving disinfectants. Moscow: Meditsina; 2006. (in Russian)
12. Plakunov V.K., Strelkova E.A., Zhurina M.V. Persistence and adaptive mutagenesis in biofilms. *Mikrobiologiya [Microbiology].* 2010; 79 (4): 447–58. (in Russian)
13. Detusheva E.V. Modeling of biofilm in bacteria on a dense nutrient medium and studying the patterns of formation of resistance to triclosan: *Autobstract of Diss.* Obolensk; 2016. (in Russian)
14. Titova S.V., Verkina L.M., Kirilova O.D., Lysova L.K., et al. Influence of hydrogen dioxide and chloramine B on biofilms of Koch's bacillus. *Dezinfektsionnoe delo [Disinfection Affairs].* 2015; (3): 6–13. (in Russian)