

Ильякова А.В., Шестопалов Н.В., Федорова Л.С., Белова А.С.

## Возможность использования спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в производстве дезинфектантов

ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора, 117246, Москва

**Введение.** В последние годы инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), приносят всё больший экономический и социальный ущерб. Микроорганизмы, циркулирующие в медицинских организациях, — возбудители ИСМП, становятся устойчивыми к большинству антибиотиков и многим дезинфектантам. Существует необходимость в создании альтернативных методов борьбы с микроорганизмами. Цель работы — определить антагонистическую активность штаммов бактерий рода *Bacillus* в отношении тест-микроорганизмов как потенциальной основы для разработки отечественных моюще-дезинфицирующих средств на основе пробиотиков.

**Материал и методы.** В качестве основного объекта исследования использованы штаммы *Bacillus subtilis* 2/10 ВКПМ В-2896; *Bacillus subtilis* ВКПМ В-1283; *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-5397; *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-5462. На первом этапе исследований антагонистическая активность штаммов изучена методом лунок, на втором этапе исследований антагонистическая активность изучена на тест-поверхностях, на третьем этапе исследований изучена эффективность композиции, содержащей штаммы *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 и сульфенол 0,5%.

**Результаты.** В результате исследований выявлено антагонистическое действие бацилл в отношении тест-микроорганизмов. При контаминации поверхностей тест-микроорганизмами (*S. aureus* ATCC 6538-Р, *E. coli* ATCC 10531, *C. albicans* ATCC 10231) с последующим нанесением спор *Bacillus* наблюдается снижение обсеменённости тест-микроорганизмами через 24 ч на 97,07–100%. Использование спор *B. subtilis* ВКПМ В-1283 и *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 вместе с моющим компонентом для обработки поверхностей, контаминированных тест-микроорганизмами (*S. aureus* ATCC 6538-Р, *E. coli* ATCC 10531, *C. albicans* ATCC 10231), обеспечивает снижение микробной обсеменённости через 4 ч на 99,97%.

**Заключение.** *B. subtilis* 2/10 ВКПМ В-2896, *B. subtilis* ВКПМ В-1283 и *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 перспективны для использования в качестве пробиотиков как основа моюще-дезинфицирующих средств.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** спорообразующие бактерии рода *Bacillus*; пробиотики; санация; моюще-дезинфицирующие средства на основе пробиотиков.

**Для цитирования:** Ильякова А.В., Шестопалов Н.В., Федорова Л.С., Белова А.С. Возможность использования спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в производстве дезинфектантов. Гигиена и санитария. 2020; 99 (5): 436-442. DOI: <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-5-436-442>

**Для корреспонденции:** Ильякова Анастасия Васильевна, мл. науч. сотр. лаборатории проблем дезинфекции ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, Москва. E-mail: a.kurchina@mail.ru

**Конфликт интересов.** Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Федорова Л.С., Белова А.С.; сбор и обработка материала – Ильякова А.В.; статистическая обработка – Ильякова А.В.; написание текста – Ильякова А.В.; редактирование – Шестопалов Н.В., Федорова Л.С.; утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Поступила: 09.08.2019

Принята к печати: 25.02.2020

Опубликована: 07.07.2020

Ilyakova A.V., Shestopalov N.V., Fedorova L.S., Belova A.S.

## The possibility of using bacteria *Bacillus* in the production of disinfectants

Scientific Research Disinfectology Institute, Moscow, 117246, Russian Federation

**Introduction.** In recent years, healthcare-associated infections (HAIs) cause ever greater economic and social damage. Microorganisms circulating in medical institutions the causative agents of HAIs, become resistant to most antibiotics and many disinfectants. There is a need to create alternative mechanisms for controlling microorganisms.

**The purpose of the work** is to determine the antagonistic activity of bacteria strains of the genus *Bacillus* in relation to test microorganisms, as a potential basis for the development of domestic detergents and disinfectants based on probiotics.

**Material and methods.** The strains of *Bacillus subtilis* 2/10 VKPM В-2896; *Bacillus subtilis* ВКПМ В-1283; *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-5397; *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-5462 were the main object of study. At the first stage of the studies, the antagonistic activity of the strains was studied by the well method, at the second stage of the studies, the antagonistic activity was studied at the test object, and at the third stage of the studies, the effectiveness of the composition containing *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 and sulfonol strains was studied.

**Results.** As a result of studies, the antagonistic effect of bacilli against test microorganisms was revealed. When surfaces are contaminated with test microorganisms (*S. aureus* ATCC 6538-Р, *E. coli* ATCC 10531, *C. albicans* ATCC 10231) and subsequent application of *Bacillus* spores, a significant reduction in the seeding rate with test microorganisms is observed after 24 hours by 97.07–100%. The use of *B. subtilis* ВКПМ В-1283 and *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 spores together with a detergent component for treating surfaces contaminated with test microorganisms (*S. aureus* ATCC 6538-Р, *E. coli* ATCC 10531, *C. albicans* ATCC 10231) provides a reduction in microbial seeding after 4 hours by 99.97 %.

**Conclusions.** *B.subtilis* 2/10 VKPM B-2896, *B.subtilis* VKPM B-1283 and *B.licheniformis* VKPM B-5397 are promising for the use as probiotics, as the basis of detergents and disinfectants.

**К е y o r d s :** bacteria *Bacillus*; probiotics; sanitation; cleaning and disinfectants based on probiotics.

**For citation:** Ilyakova A.V., Shestopalov N.V., Fedorova L.S., Belova A.S. The possibility of using bacteria *Bacillus* in the production of disinfectants. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99 (5): 436-442. DOI: <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-5-436-442>. (In Russian)

**For correspondence:** Anastasia V. Ilyakova, MD, junior researcher at the laboratory of disinfectology problems, Scientific Research Disinfectology Institute, Moscow, 117246, Russian Federation. E-mail: a.kurchina@mail.ru

**Information about the authors:**

Ilyakova A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1867-3495>; Shestopalov N.V., <http://orcid.org/0000-0002-9973-3508>  
Fedorova L.S., <http://orcid.org/0000-0003-2663-0273>; Belova A.S., <http://orcid.org/0000-0002-9473-1650>

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Contribution:** Ilyakova A.V. – Material collection and processing, statistical processing, writing the text; Shestopalov N.V. – Editing; Fedorova L.S. – Research concept and design, editing; Belova A.S. – Research concept and design. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Received: August 09, 2019  
Accepted: February 25, 2019  
Published: July 07, 2020

## Введение

В настоящее время вопросы больничной гигиены и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), остаются исключительно важными в связи с высоким уровнем внутрибольничной заболеваемости, которая причиняет обществу значительный социальный и экономический ущерб [1, 2]. По данным российских исследователей, ежегодно в стране возникает около 2,5 млн случаев ИСМП, при этом экономический ущерб от этих болезней может достигать 15 млрд рублей. ИСМП занимают десятое место в ряду причин смертности населения и поражают в среднем от 5 до 15% госпитализированных пациентов, а в отделениях высокого инфекционного риска этот показатель достигает 40% [3, 4]. Проблема ИСМП неразрывно связана с формированием и широким распространением «госпитальных» штаммов возбудителей ИСМП, обладающих множественной резистентностью к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, что негативно влияет на качество лечения пациентов и эффективность профилактических мероприятий [5, 6]. Затраты на антибиотики и дезинфицирующие средства не приносят желаемого эффекта.

В комплексе санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий, направленных на профилактику ИСМП, важную роль играют дезинфектологические технологии, предусматривающие использование дезинфицирующих средств (ДС), обеспечивающих устранение патогенных и условно патогенных микроорганизмов с объектов окружающей среды, в том числе внутрибольничной среды, служащих факторами передачи инфекций [6, 7]. Для обеззараживания объектов внутрибольничной среды в настоящее время разработано большое количество разнообразных химических ДС (более 1500 наименований), каждое из которых имеет свои преимущества и недостатки. Особенностью всех химических ДС является неспецифическое действие на все виды микроорганизмов – как непатогенных, так и патогенных, в результате чего создаётся «чистая» поверхность, на которой происходит быстрая повторная контаминация патогенными и условно патогенными микроорганизмами. Дезинфекция химическими ДС даёт быстрый, но относительно короткий и нестабильный эффект и нередко является причиной появления резистентных штаммов микроорганизмов. В последние десятилетия увеличилось число сообщений о выявлении устойчивых к ДС микроорганизмов [8–11].

Согласно Национальной концепции профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, основным направлением совершенствования национальной системы профилактики ИСМП является создание новых высокоэффективных и малотоксичных дезинфици-

рующих средств для применения в организациях здравоохранения [12].

В настоящее время в качестве средств, обеспечивающих снижение микробной обсеменённости поверхностей, могут рассматриваться моюще-дезинфицирующие средства на основе пробиотиков, которые представляют собой новое поколение моющих средств, содержащих спорообразующие бактерии рода *Bacillus* в сочетании с поверхностно-активными веществами и ферментами.

Бактерии рода *Bacillus* относятся к основным компонентам микрофлоры почвы, воды, воздуха и абсолютно безопасны для человека (кроме *B. anthracis*, *B. cereus*). Бактерии рода *Bacillus* продуцируют широкий спектр биологически активных веществ, в том числе ферментов, липопептидных и других антибиотиков. Это обуславливает высокую бактерицидную и бактериостатическую активность *Bacillus* spp. в отношении патогенных и условно патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также фунгицидную (фунгистатическую) активность в отношении грибов, что позволяет их рассматривать как перспективных биологических агентов для создания противомикробных препаратов [13–16].

Применение пробиотиков в медицинских организациях является одним из альтернативных методов профилактики ИСМП. Результаты отечественных и зарубежных научных исследований показывают, что ежедневная обработка поверхностей моюще-дезинфицирующими средствами на основе пробиотиков эффективно снижает уровень патогенных микроорганизмов в условиях больничной среды [17–26]. В отличие от химических ДС моюще-дезинфицирующие средства на основе пробиотиков стабильно снижают загрязнение патогенами на поверхностях помещений в медицинских организациях [25], что также приводит к сокращению резистентных видов микроорганизмов [21] и, наконец, вызывает значительное снижение риска возникновения ИСМП [22, 23]. Однако, несмотря на востребованность и явные преимущества перед химическими ДС, отечественные средства на основе пробиотиков отсутствуют.

Целью настоящего исследования было изучение антагонистической активности штаммов бактерий рода *Bacillus* как потенциальной основы для разработки отечественных моюще-дезинфицирующих средств на основе пробиотиков.

**Задачи исследования:**

1. определить антагонистическую активность штаммов бактерий рода *Bacillus* в отношении тест-микроорганизмов из коллекции культур ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора;
2. определить динамику изменения обсеменённости поверхностей искусственно нанесёнными тест-микроорганизмами до и после обработки спорами бацилл;

3. определить срок воздействия спор бацилл, через который наблюдается снижение количества или отсутствие тест-микроорганизмов на поверхностях и уровень обсеменённости этих поверхностей спорами бацилл.

## Материал и методы

На первом этапе исследований изучена антагонистическая активность штаммов бактерий рода *Bacillus* с использованием тест-микроорганизмов из «Коллекции тест-микроорганизмов ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора».

В качестве основного объекта исследования использовали штаммы из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ): *Bacillus subtilis* 2/10 ВКПМ В-2896; *Bacillus subtilis* ВКПМ В-1283; *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-5397; *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-5462. Представленные штаммы не являются генетически модифицированными и относятся к микроорганизмам, не патогенным для человека, согласно классификации микроорганизмов, приведённой в Санитарных правилах СП 1.3.2322-08 [27].

В качестве тест-микроорганизмов использовали грамотрицательные бактерии: *E. coli* ATCC 10531, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. typhimurium* ATCC 13311; грамположительные бактерии: *S. aureus* ATCC 6538-Р, *E. hirae* ATCC 10541; грибы и дрожжи: *C. albicans* ATCC 10231, *T. mentagrophytes* ATCC 9533, *A. brasiliensis* ATCC 16404.

Антагонистическую активность культур бактерий рода *Bacillus* оценивали модифицированным методом лунок в толще агара по измерению диаметра зон подавления роста нанесённого тест-микроорганизма в мм [28].

Штаммы бактерий рода *Bacillus* засеивали на скошенный пшеничный агар и выращивали при температуре 37 °С двое суток в термостате, а затем ещё пять суток при температуре 20 °С в тёмном месте для получения достаточного спорообразования. Суспензию спор каждого вида смывали с агара стерильным физиологическим раствором. Далее готовили взвесь, содержащую 10<sup>5</sup> спор/мл, и по 0,1 мл наносили на поверхность мясопептонного агара, распределяли по поверхности среды в чашках Петри. Посевы инкубировали в термостате при 37 °С в течение 48 ч. Затем стерильными стеклянными цилиндриками определённого диаметра (6–8 мм) вырезали агаровый диск (блок) с выросшей культурой бактерий *Bacillus* и устанавливали его в другой чашке Петри на поверхности агаровой среды, только что засеянной суточной культурой тест-микроорганизма. Чашку выдерживали в течение 1 ч в холодильнике (во избежание преждевременного роста тест-микроорганизма) для диффузии ингибиторных соединений из блока в толщу агара с тест-микроорганизмом, а затем инкубировали в условиях, оптимальных для тест-микроорганизма. Учёт результатов проводили через 48 ч инкубирования при 37 °С по величине зон угнетения роста тест-штаммов. Контролем роста тест-микроорганизмов служил их параллельный высев на чашки Петри с той же плотной средой (мясопептонным агаром) без исследуемой ассоциации антагонистов.

На втором этапе исследований изучена антагонистическая активность штаммов бактерий рода *Bacillus* при нанесении на тест-поверхности, контаминированные тест-микроорганизмами.

В качестве тест-поверхностей использовали шероховатую кафельную плитку, а в качестве тест-микроорганизмов из грамположительных бактерий – *S. aureus* ATCC 6538-Р, грамотрицательных бактерий – *E. coli* ATCC 10541, грибов – *C. albicans* ATCC 10231. Споровую культуру бактерий *Bacillus* готовили так же, как и на предыдущем этапе исследований. Суспензию спор бактерий рода *Bacillus* готовили на стерильном физиологическом растворе, количество жизнеспособных спор в исходной суспензии составляло от 3,1 · 10<sup>6</sup> до 5 · 10<sup>6</sup> спор/мл.

Поверхности размером 100 см<sup>2</sup> контаминировали 0,5 мл взвеси тест-микроорганизма, содержащей 2 · 10<sup>9</sup> клеток в 1 мл. После подсушивания на поверхности наносили суспензию спор из расчёта 1 мл на 100 см<sup>2</sup>, распределяя стерильным шпателем по всей поверхности. Контрольные поверхности обрабатывали водой.

Затем с опытных и контрольных поверхностей через 2; 4; 6 и 24 ч отбирали смывы, делали высевы на плотные питательные среды и помещали их в термостат. Высевы *S. aureus* ATCC 6538-Р делали на желточно-солевой агар, *E. coli* ATCC 10541 – на агар Эндо, *C. albicans* ATCC 10231 – на агар Сабуро и для определения общего микробного числа – на мясопептонный агар. Через двое суток проводили подсчёт выросших колоний.

На третьем этапе исследований изучена антимикробная активность композиции, содержащей *B. subtilis* ВКПМ В-1283; *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 и моющей компонент, при обработке тест-поверхностей, контаминированных тест-микроорганизмами.

В качестве моющего компонента был выбран сульфенол – анионное поверхностно-активное вещество, которое представляет собой смесь изомеров натриевых солей алкилбензолсульфонокислот (их содержание в продукте составляет не менее 80%) и сульфата натрия (его массовая доля не превышает 15%). Сульфенол применяется как смачивающее, моющее и эмульгирующее вещество в качестве компонента средств бытовой химии для удаления загрязнений с различных поверхностей. В концентрации 0,2–0,5% сульфенол используется для мытья поверхностей и посуды [29].

В исследованиях использовали стерильный раствор сульфенола в концентрации 0,5%. Суспензию спор *B. subtilis* ВКПМ В-1283 и *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 готовили на стерильной дистиллированной воде. По 1 мл суспензии добавляли в 8 мл 0,5% раствора сульфенола. Количество жизнеспособных спор в растворе составляло от 3,5 · 10<sup>6</sup> до 5 · 10<sup>6</sup> спор/мл.

В качестве тест-поверхностей использовали шероховатую кафельную плитку, а в качестве тест-микроорганизмов *S. aureus* ATCC 6538-Р, *E. coli* ATCC 10541, *C. albicans* ATCC 10231.

Поверхности контаминировали тест-микроорганизмами из расчёта 0,5 мл взвеси, содержащей 2 · 10<sup>9</sup> клеток в 1 мл, на 100 см<sup>2</sup>, подсушивали и обрабатывали поверхности композицией, содержащей споры бактерий *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 и 0,5% сульфенола из расчёта 1 мл на 100 см<sup>2</sup>. Контрольные поверхности обрабатывали водой.

Затем с поверхностей через 2; 4; 6 и 24 ч отбирали смывы и делали высевы на плотные питательные среды для подсчёта общего микробного числа на мясо-пептонный агар, *S. aureus* ATCC 6538-Р – на желточно-солевой агар, *E. coli* ATCC 10541 – на агар Эндо, *C. albicans* ATCC 10231 – на агар Сабуро и помещали их в термостат. Через двое суток проводили подсчёт выросших колоний.

Эксперименты ставили не менее чем в трёх повторностях. Всего выполнено 502 микробиологических исследования. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Excel. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

В зависимости от диаметра зон угнетения роста тест-микроорганизмов выделяют высокую (от 11 до 30 мм), среднюю (в пределах 4–10 мм) и слабую (до 4 мм) антагонистическую активность [14]. Согласно общей фармакопейной статье ОФС.1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков» антагонистическую активность штаммов-продуцентов, входящих в состав пробиотиков для медицинского применения, считают высокой, если размер зоны угнетения роста тест-штаммов составляет не менее 10 мм – для штаммов-продуцентов, входящих в спорообразующие пробиотики [30].

Таблица 1

Антагонистическая активность штаммов бактерий рода *Bacillus* в отношении тест-микроорганизмов

Штамм-антагонист	Зона ингибирования роста тест-микроорганизма, мм							
	<i>E. coli</i> ATCC 10531	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	<i>E. hirae</i> ATCC 10541	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9533	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404
<i>B. subtilis</i> 2/10 ВКПМ В-2896	23 ± 0,1	14 ± 0,1	19 ± 0,1	15 ± 0,1	23 ± 0,1	21 ± 0,1	12 ± 0,1	13 ± 0,1
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В-1283	24 ± 0,1	17 ± 0,1	21 ± 0,1	16 ± 0,1	22 ± 0,1	23 ± 0,1	14 ± 0,1	15 ± 0,1
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В-5397	18 ± 0,1	9 ± 0,1	17 ± 0,1	25 ± 0,1	27 ± 0,1	22 ± 0,1	16 ± 0,1	12 ± 0,1
<i>B. amyloliquefaciens</i> ВКПМ В-5462	4 ± 0,1	3 ± 0,1	4 ± 0,1	2 ± 0,1	5 ± 0,1	2 ± 0,1	1 ± 0,1	1 ± 0,1

Как показывают данные табл. 1, наиболее высокой антагонистической активностью по отношению ко всем исследуемым тест-микроорганизмам обладал штамм *B. subtilis* ВКПМ В-1283. Диаметр зон подавления роста тест-микроорганизмов колебался в пределах от 14 до 24 мм. Штамм *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 проявлял наиболее высокую антагонистическую активность по отношению к грамположительным бактериям (*S. aureus* ATCC 6538-P, *E. hirae* ATCC 10541), зона подавления роста колебалась в пределах 25–27 мм, среднюю активность – в отношении *P. aeruginosa* ATCC 15442, зона подавления роста составляла 9 мм. Слабую антагонистическую активность проявлял штамм *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-5462, диаметр зон угнетения роста по отношению к тест-микроорганизмам отмечен в пределах 1–5 мм.

В результате проведенных исследований на первом этапе были отобраны 2 штамма *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 с наиболее высокой антагонистической активностью по отношению ко всем исследуемым тест-микроорганизмам.

Далее были проведены исследования антагонистической активности штаммов *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 на тест-поверхности.

Результаты исследований по изучению антагонистической активности штаммов бактерий рода *Bacillus* при обработке поверхностей, контаминированных тест-микроорганизмами, представлены в табл. 2, 3.

Анализ результатов изучения антагонистической активности штаммов *B. subtilis* ВКПМ В-1283 и *B. licheniformis*

ВКПМ В-5397 при нанесении суспензии спор на тест-поверхности, контаминированные тест-микроорганизмами (см. табл. 2, 3), показал, что при отборе смывов через 4 ч после нанесения спор обсеменённость поверхностей тест-микроорганизмами начинает снижаться, и через 24 ч на поверхностях остаются единичные тест-микроорганизмы. Количество микроорганизмов на контрольных поверхностях *S. aureus* ATCC 6538-P через сутки составляло  $5,2 \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>2</sup>, а для *C. albicans* ATCC 10231 –  $5,3 \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>2</sup>. Культура *E. coli* ATCC 10531 через 24 ч не была выявлена в смывах с опытных поверхностей, в то время как в смывах с контрольных поверхностей находилось  $3,1 \cdot 10^2$  КОЕ/см<sup>2</sup>. Общее микробное число на опытных поверхностях, складывающееся из споровой микрофлоры и тест-микроорганизма, колебалось в пределах от  $10^3$  до  $10^4$  КОЕ/см<sup>2</sup>.

Результаты исследований изучения антимикробной активности композиции, содержащей споры *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 и моющей компонент, при обработке тест-поверхностей, контаминированных тест-микроорганизмами, представлены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, обработка тест-поверхностей композицией, содержащей споры *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 и сульфенол (0,5%), приводит к значительному снижению обсеменённости поверхностей тест-микроорганизмами. Обсеменённость поверхностей *S. aureus* ATCC 6538-P снижалась на 99,96% по сравнению с контролем при экспозиции 2 ч, *E. coli* ATCC 10531 –

Таблица 2

Микробная обсеменённость тест-поверхностей, контаминированных *S. aureus* ATCC 6538-P, *E. coli* ATCC 10531, *C. albicans* ATCC 10231, после нанесения суспензии спор *B. subtilis* ВКПМ В-1283

Тест-микроорганизм	Экспозиция, ч	Количество тест-микроорганизмов		Снижение микробной обсеменённости на опытных тест-поверхностях, %	Общее микробное число на опытных тест-поверхностях, КОЕ/см <sup>2</sup>
		на контрольной поверхности, КОЕ/см <sup>2</sup>	на опытной тест-поверхности, КОЕ/см <sup>2</sup>		
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	2	$3,3 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^3$	98,84	$5,9 \cdot 10^3$
	4	$3,1 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^3$	99,38	$5,1 \cdot 10^3$
	6	$3,1 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$	99,61	$5,5 \cdot 10^3$
	24	$5,2 \cdot 10^3$	12	99,99	$1,2 \cdot 10^4$
<i>E. coli</i> ATCC 10531	2	$3,1 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^3$	99,12	$5,5 \cdot 10^3$
	4	$2,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^3$	99,40	$5,7 \cdot 10^3$
	6	$2,2 \cdot 10^3$	46	97,90	$5,1 \cdot 10^3$
	24	$2,2 \cdot 10^2$	0	100,0	$1,1 \cdot 10^4$
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2	$3,7 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^3$	99,00	$5,3 \cdot 10^3$
	4	$3,7 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^2$	99,89	$5,2 \cdot 10^3$
	6	$4,1 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^2$	99,39	$5,7 \cdot 10^3$
	24	$5,4 \cdot 10^3$	38	99,29	$7,3 \cdot 10^3$

Таблица 3

Микробная обсеменённость тест-поверхностей, контаминированных *S. aureus* ATCC 6538-P, *E. coli* ATCC 10531, *C. albicans* ATCC 10231, после нанесения суспензии спор *B. licheniformis* ВКПМ В-5397

Тест-микроорганизм	Экспозиция, ч	Количество тест-микроорганизмов		Снижение микробной обсеменённости на опытных тест-поверхностях, %	Общее микробное число на опытных тест-поверхностях, КОЕ/см <sup>2</sup>
		на контрольной поверхности, КОЕ/см <sup>2</sup>	на опытной тест-поверхности, КОЕ/см <sup>2</sup>		
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	2	3,2 · 10 <sup>5</sup>	1,7 · 10 <sup>3</sup>	99,46	5,3 · 10 <sup>3</sup>
	4	3,1 · 10 <sup>5</sup>	1,2 · 10 <sup>3</sup>	99,61	3,7 · 10 <sup>3</sup>
	6	5,1 · 10 <sup>4</sup>	56	99,86	2,2 · 10 <sup>4</sup>
	24	2,2 · 10 <sup>3</sup>	5	99,99	2,9 · 10 <sup>4</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 10531	2	2,9 · 10 <sup>5</sup>	2,5 · 10 <sup>3</sup>	99,13	8,3 · 10 <sup>3</sup>
	4	2,1 · 10 <sup>5</sup>	1,2 · 10 <sup>2</sup>	99,94	5,1 · 10 <sup>3</sup>
	6	2,2 · 10 <sup>4</sup>	39	99,36	2,1 · 10 <sup>4</sup>
	24	2,3 · 10 <sup>2</sup>	0	100,00	2,7 · 10 <sup>4</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2	3,5 · 10 <sup>5</sup>	3,4 · 10 <sup>3</sup>	99,02	3,3 · 10 <sup>3</sup>
	4	3,3 · 10 <sup>5</sup>	2,7 · 10 <sup>3</sup>	99,18	4,1 · 10 <sup>3</sup>
	6	3,1 · 10 <sup>4</sup>	2,3 · 10 <sup>2</sup>	99,25	2,1 · 10 <sup>4</sup>
	24	5,3 · 10 <sup>3</sup>	18	99,66	2,5 · 10 <sup>4</sup>

Таблица 4

Микробная обсеменённость тест-поверхностей, контаминированных *S. aureus* ATCC 6538-P, *E. coli* ATCC 10531, *C. albicans* ATCC 10231, после обработки композицией, содержащей споры *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 и 0,5% раствор сульфанола

Тест-микроорганизм	Экспозиция, ч	Количество тест-микроорганизмов		Снижение микробной обсеменённости на тест-поверхностях, %	Общее микробное число на опытных тест-поверхностях, КОЕ/см <sup>2</sup>
		на контрольной поверхности, КОЕ/см <sup>2</sup>	на опытной тест-поверхности, КОЕ/см <sup>2</sup>		
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	2	3,7 · 10 <sup>5</sup>	1,2 · 10 <sup>2</sup>	99,96	6,3 · 10 <sup>3</sup>
	4	3,4 · 10 <sup>5</sup>	87	99,97	3,7 · 10 <sup>4</sup>
	6	3,5 · 10 <sup>4</sup>	16	99,99	3,1 · 10 <sup>4</sup>
	24	5,2 · 10 <sup>3</sup>	5	99,90	3,3 · 10 <sup>4</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 10531	2	2,7 · 10 <sup>5</sup>	59	99,97	3,3 · 10 <sup>4</sup>
	4	2,1 · 10 <sup>5</sup>	43	99,97	5,1 · 10 <sup>4</sup>
	6	2,2 · 10 <sup>4</sup>	17	99,92	2,1 · 10 <sup>4</sup>
	24	3,1 · 10 <sup>2</sup>	0	0	2,7 · 10 <sup>5</sup>
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2	3,5 · 10 <sup>5</sup>	1,5 · 10 <sup>2</sup>	99,96	4,3 · 10 <sup>4</sup>
	4	3,3 · 10 <sup>5</sup>	99	99,97	4,2 · 10 <sup>4</sup>
	6	2,8 · 10 <sup>5</sup>	81	99,97	2,1 · 10 <sup>5</sup>
	24	5,3 · 10 <sup>3</sup>	12	99,77	2,5 · 10 <sup>5</sup>

на 99,97%, *C. albicans* ATCC 10231 – на 99,96%. Общее микробное число на опытных поверхностях, складывающееся из споровой микрофлоры и тест-микроорганизма, изменялось в пределах от 10<sup>3</sup> до 10<sup>5</sup> КОЕ/см<sup>2</sup>.

## Обсуждение

Способность бактерий рода *Bacillus* к спорообразованию и высокая устойчивость этих спор к физическим и химическим факторам позволяют использовать их в составе моюще-дезинфицирующих средств. Как только параметры окружающей среды улучшаются, споры переходят в вегетативное состояние, начинают размножаться и конкурировать с другими видами бактерий и грибов за пищу и влагу, тем самым подавляя рост условно патогенных и патогенных микроорганизмов.

Полученные результаты показали, что при использовании спор бактерий рода *Bacillus* для снижения обсеменённости поверхностей значительно уменьшается рост условно патогенных и патогенных микроорганизмов. Присутствие пробиотиков на поверхностях в помещениях предотвращает повторную контаминацию микроорганизмами и обуславливает поддержание стабильных гигиенических условий поверхностей.

Таким образом, *B. subtilis* 2/10 ВКПМ В-2896, *B. subtilis* ВКПМ В-1283 и *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 обладают бактерицидной и фунгицидной активностью и рассматриваются как перспективные биологические агенты для создания моюще-дезинфицирующих средств на основе пробиотиков.

## Заключение

1. Штаммы *B. subtilis* 2/10 ВКПМ В-2896, *B. subtilis* ВКПМ В-1283, *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 проявляют высокую антагонистическую активность в отношении широкого спектра микроорганизмов (бактерий и грибов). Штамм *B. amyloliquefaciens* ВКПМ В-5462 не обладает достаточной антагонистической активностью.

2. Под воздействием *B. subtilis* ВКПМ В-1283 и *B. licheniformis* ВКПМ В-5397 наблюдается снижение обсеменённости поверхностей тест-микроорганизмами через 24 ч на 99,29–100%.

3. Добавление к суспензии спор моющего компонента повышает эффективность обработки поверхностей, контаминированных тест-микроорганизмами (*S. aureus* ATCC 6538-P, *E. coli* ATCC 10531, *C. albicans* ATCC 10231), и обеспечивает снижение микробной обсеменённости через 4 ч на 99,97%, а через 24 ч – на 99,99–100%.

## Литература

(пп. 19–26 см. References)

1. Акимкин В.Г. Перспективы научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Дезинфекционное дело*. 2014; 3: 5–11.
2. Шербо А.П. *Больничная гигиена: руководство для врачей*. СПб.: СПбМАПО; 2000. 489 с.
3. Найговзина Н.Б., Попова А.Ю., Бирюкова Е.Е., Ежлова Е.Б., Игонина Е.П., Покровский В.И. и соавт. Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2018; 2: 6–14.
4. Акимкин В.Г. Актуальные направления научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Поликлиника*. 2014; 6: 6.
5. Шестопалов Н.В., Акимкин В.Г. Перспективные направления научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Медицинский альманах*. 2015; 5 (40): 26–30.
6. Акимкин В.Г., Тутельян А.В., Брусина Е.Б. Актуальные направления научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; 2: 40–4.
7. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Фельдблюм И.В. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. 2012.
8. Шестопалов Н.В., Гололобова Т.В., Фёдорова Л.С., Серов А.А., Мругова Т.М., Рулева А.И. Оценка чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам. *Дезинфекционное дело*. 2017; 4: 76–7.
9. Шестопалов Н.В., Фёдорова Л.С., Серов А.А., Гололобова Т.В., Рулева А.И., Сорокина Л.А. Проблемы мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам в медицинских организациях. *Дезинфекционное дело*. 2018; 2: 14–22.
10. Шестопалов Н.В., Фёдорова Л.С., Серов А.А., Курчина А.В., Левчук Н.Н., Белова А.С. Изучение устойчивости госпитальных штаммов микроорганизмов к дезинфицирующим средствам как мера контроля инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Дезинфекционное дело*. 2016; 4: 63.
11. Ковалишена О.В. Возбудители ВБИ и их устойчивость к дезинфектантам. *Дезинфекционное дело*. 2014; 3: 33–9.
12. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06.11.2011).
13. Бала С.С. Антагонистическая активность пробиотиков на основе аэробных спорообразующих бактерий. *Успехи современного естествознания*. 2004; 12: 84.
14. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность. *Химическая и биологическая безопасность*. 2007; 2–3: 20–41.
15. Блинкова Л.П., Семенов С.А., Бутова Л.Г. и соавт. Антагонистическая активность свежeweделенных штаммов бактерий рода *Bacillus*. *ЖМЭИ*. 1994; 5: 71–2.
16. Сорокулова И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов. *Антибиотики и химиотерапия*. 1996; 41 (10): 13–5.
17. Цвилова И.М., Белова А.С., Федорова Л.С. Перспективы использования пробиотиков с целью профилактики внутрибольничных инфекций. Актуальные вопросы теории и практики дезинфектологии. В кн.: *Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 75-летию НИИ дезинфектологии*. М.: ИТАР-ТАСС; 2008: 186–7.
18. Савина И.В., Сеитов М.С. Влияние препарата PIP AHS на микрофлору животноводческих помещений. *Ветеринарные науки*. 2012; 1: 95–8.
27. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08.
28. Егоров Н.С. *Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учёта их антибиотической активности*. М.: Издательство МГУ; 1957. 78 с.
29. *Поверхностно-активные вещества: справочник*. Под ред. А.А. Абрамова, Г.М. Гаевой. М.; 1979. 376 с.
30. Общая фармакопейная статья ОФС.1.7.2.0009.15. Определение специфической активности пробиотиков.

## References

1. Akimkin V.G. The prospects of scientific research in the field of nonspecific prevention of the healthcare-associated infection. *Dezinfektsionnoye delo [Disinfection Affairs]*. 2014; 3: 5–11. (in Russian)
2. Shcherbo A.P. *Hospital hygiene. Guide for doctors. [Bol'nichnaya gigiyena. Rukovodstvo dlya vrachey]*. Saint Petersburg: SPbMAPO; 2000. 489 p. (in Russian)
3. Naygovzina N.B., Popova A.Yu., Biryukova E.Y., Yezhlova E.B., Igonina E.P., Pokrovskiy V.I. et al. Optimization of a system of measures of fight and prevention of the healthcare-associated infection in the Russian Federation. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni. Aktual'nyye voprosy*. 2018; 2: 6–14. (in Russian)
4. Akimkin V.G. The relevant directions of scientific research in the field of nonspecific prevention of the healthcare-associated infection. *Poliklinika*. 2014; 6: 6. (in Russian)
5. Shestopalov N.V., Akimkin V.G. The perspective directions of scientific research in the field of nonspecific prevention of the healthcare-associated infection. *Meditinskij al'manakh*. 2015; 5 (40): 26–30. (in Russian)
6. Akimkin V.G., Tutel'yan A.V., Brusina E.B. The relevant directions of scientific research in the field of nonspecific prevention of the healthcare-associated infection. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni. Aktual'nyye voprosy*. 2014; (2): 40–4. (in Russian)
7. Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., Fel'dblyum I.V. The national concept of prevention of the healthcare-associated infection. 2012. (in Russian)
8. Shestopalov N.V., Gololobova T.V., Fedorova L.S., Serov A.A., Mruгова Т.М., Ruleva A.I. Assessment of sensitivity of microorganisms to disinfectants. *Dezinfektsionnoye delo [Disinfection Affairs]*. 2017; 4 (102): 76–7. (in Russian)
9. Shestopalov N.V., Fedorova L.S., Serov A.A., Gololobova T.V., Ruleva A.I., Sorokina L.A. Problems of monitoring of stability of microorganisms to disinfectants in the medical organizations. *Dezinfektsionnoye delo [Disinfection Affairs]*. 2018; 2 (104): 14–22. (in Russian)
10. Shestopalov N.V., Fedorova L.S., Serov A.A., Kurchina A.V., Levchuk N.N., Belova A.S. Studying of stability of hospital strains of microorganisms to disinfectants as a control measure of the healthcare-associated infections. *Dezinfektsionnoye delo [Disinfection Affairs]*. 2016; 4 (98): 63. (in Russian)
11. Kovalishena O.V. HAI activators and their resistance to disinfectants. *Dezinfektsionnoye delo [Disinfection Affairs]*. 2014; 3: 33–9. (in Russian)
12. «The national concept of prevention of the healthcare-associated infection [Natsional'naya kontseptsiya profilaktiki infektsiy, svyazannykh s okazaniem meditsinskoj pomoshchi] (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 06.11.2011). (in Russian)
13. Bala S.S. Antagonistic activity of probiotics based on aerobic spore-forming bacteria. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya*. 2004; 12: 84. (in Russian)
14. Pokhilenko V.D., Perelygin V.V. Probiotics based on spore-forming bacteria and their safety. *Khimicheskaya i biologicheskaya bezopasnost' [Chemical and Biological Safety]*. 2007; 2–3: 20–41. (in Russian)
15. Blinkova L.P., Semenov S.A., Butova L.G. Antagonistic activity of freshly isolated strains of bacteria of the genus *Bacillus*. *ZhMEI*. 1994; 5: 71–2. (in Russian)
16. Sorokulova I.B. Prospects for the use of bacteria of the genus *Bacillus* for the construction of new biological products. *Antibiotiki i khimioterapiya [Antibiotics and chemotherapy]*. 1996; 41 (10): 13–5. (in Russian)
17. Tsvirova I.M., Belova A.S., Fedorova L.S. The prospects of use of probiotics for the purpose of prevention of intrahospital infections. Aktual'nye voprosy teorii i praktiki dezinfektologii. In: *Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference dedicated to the 75<sup>th</sup> anniversary of the Research Institute of Disinfectology [Materialy Vserossiyskoj nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 75-letiyu NII dezinfektologii]*. Moscow: IТАR-TASS; 2008: 186–7. (in Russian)
18. Savina I.V., Seitov M.S. The influence of the drug PIP AHS on the microflora of livestock buildings. *Veterinarnyye nauki [Veterinary Sciences]*. 2012; 1: 95–8.
19. Al-Marzoq F., Al Bayat S., Sayyar F., Ishaq H., Nasralla H., Koutaich R. et al. Can probiotic cleaning solutions replace chemical disinfectants in dental clinics? *Eur J Dent*. 2018; 12: 532–9.
20. Caselli E., Antonioli P., Mazzacane S. Safety of probiotics used for hospital environmental sanitation. *J Hosp Infect*. 2016; 94 (2): 193–4.
21. Caselli E., D'Accolti M., Vandini A., Lanzoni L., Camerada M.T., Coccagna M. et al. Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation. *PLoS ONE*. 2016; 11 (2): e0148857. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148857>
22. Caselli E., Brusaferrero S., Coccagna M., Arnoldo L., Berloco F., Antonioli P. et al. Reducing healthcare-associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: A multicentre, prospective, intervention study. *PLoS ONE*. 2018; 13 (7): e0199616. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616>

23. Caselli E., Arnoldo L., Rognoni C., D'Accolti M., Soffritti I., Lanzoni L. et al. Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: a multicenter study. *Infect Drug Resist.* 2019; 12: 501–10. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
24. La Fauci V., Costa G.B., Anastasi F., Facciola A., Grillo O.C. An innovative approach to hospital sanitization using probiotics: *in vitro* and field trials. *J Microb Biochem Technol.* 2015; 7: 160–4. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000198>
25. Vandini A., Frabetti A., Antonioli P., Platano D., Branchini A., Camerada M.T. et al. Reduction of the microbiological load on hospital surfaces through probiotic-based cleaning procedures: a new strategy to control nosocomial infections. *J Microbiol Exp.* 2014; 1 (5): 00027. DOI: <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00027>
26. Vandini A., Temmerman R., Frabetti A., Caselli E., Antonioli P., Balboni P.G. et al. Hard surface biocontrol in hospitals using microbial-based cleaning products. *PLoS ONE.* 2014; 9 (9): e108598. DOI: <https://doi.org/HYPER 10.1371/journal.pone.0108598>
27. Sanitary and epidemiological regulations. Safety of work with microorganisms of groups III–IV pathogenicity (danger) and pathogens of parasitic diseases. SP 1.3.2322-08. (in Russian)
28. Egorov N.S. *Isolation of antagonist microbes and biological methods for accounting for their antibiotic activity [Vydeleniye mikrobov-antagonistov i biologicheskiye metody ucheta ikh antibioticheskoy aktivnosti]*. Moscow: Izdatel'stvo MGU; 1957. 78 p. (in Russian)
29. *Surfactants: Directory [Poverkhnostno-aktivnyye veshchestva: spravochnik]*. A.A. Abramzon, G.M. Gaevoi., eds. Moscow; 1979. 376 p. (in Russian)
30. General Pharmacopoeia Article OFS.1.7.2.0009.15 Determination of specific activity of probiotics. (in Russian)